

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**PROPIEDADES DE LA LIBERACIÓN DE
NEUROTRANSMISOR EN LAS SINAPSIS FUNCIONALES
Y SILENTES: IMPLICACIONES EN FENÓMENOS DE
PLASTICIDAD SINÁPTICA**

Tesis Doctoral
Carolina Cabezas Fernández
Madrid, 2006

ABREVIATURAS

Ach:	Acetilcolina
ACSF:	líquido cefalorraquídeo artificial
AMPA:	ácido (RS)-2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
AMPArs:	receptores ionotrópicos de glutamato sensibles a AMPA
APV:	ácido D-2-amino-5-fosfonoaléico
ATP:	adenosina 5'-trifosfato
BAPTA:	ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'- tetraacético sal de tetracesio
CCh:	carbacol (cloruro de carbamilcolina)
CNQX:	6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona
CS:	colaterales de Schaffer
DMSO:	ácido dimetilsulfóxido
EGTA:	ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético
EPSC:	corriente excitadora postsináptica
EPSP:	potencial excitador postsináptico
GABA:	ácido γ -aminobutírico
GABAR _A :	receptor de GABA tipo A
LCIC:	liberación de calcio inducida por calcio
LTD:	depresión a largo plazo
LTP:	potenciación a largo plazo
mAChR:	receptor muscarínico de acetilcolina
NMDA:	N-metil-D-aspartato
NMDARs:	receptores ionotrópicos de glutamato sensibles a NMDA
no-NMDARs:	receptores ionotrópicos de glutamato no sensibles a NMDA
PPF:	facilitación por pares de pulsos
PTX:	picrotoxina
R1:	1º EPSC
R2:	2º EPSC
RE:	retículo endoplásmico
RRP:	conjunto de vesículas listo para liberar
SNC:	sistema nervioso central
STP:	plasticidad a corto plazo
V _m :	potencial de membrana

ÍNDICE

SUMMARY	5
I. INTRODUCCIÓN	6
1. Transmisión Sináptica	7
1.1 Liberación de Neurotransmisor	9
2. Plasticidad Sináptica	10
3. Transmisión Sináptica en Hipocampo.....	12
 II. OBJETIVOS	 17
 III. MATERIALES Y MÉTODOS	 19
1. Preparación y Registros	20
1.1. Obtención de las rodajas de hipocampo de rata	20
1.2. Técnicas de Registro	20
1.3. Identificación de las neuronas piramidales de la región de CA1.....	21
1.4. Soluciones de registro	21
2. Estimulación Sináptica	23
2.1. Estimulación “mínima”	23
2.2. Apareamiento de estimulación con despolarización postsináptica	25
2.3. Estimulación convencional	25
3. Análisis de los Resultados	26
4. Análisis Estadístico	27
 IV. RESULTADOS.....	 29
1. Modulación colinérgica presináptica de la transmisión glutamatérgica en hipocampo..	30
2. Las propiedades de liberación son diferentes en las sinapsis silentes y las sinapsis funcionales.....	31
3. La plasticidad sináptica a corto plazo revela diferencias en la regulación de la liberación de neurotransmisor entre las sinapsis funcionales y silentes.....	33
3.1. La PPF en las sinapsis funcionales es causada por una mayor probabilidad de liberación y una mayor potencia sináptica de R2 con respecto a R1	33
3.2. La sinapsis silentes no presentan PPF	36

4. La liberación de neurotransmisor es regulada por los reservorios intracelulares de Ca^{2+} presinápticos en las sinapsis funcionales pero no en las silentes	37
5. La conversión de sinapsis silentes en funcionales modifica las propiedades de liberación de neurotransmisor.....	40
5.1. Modulación colinérgica de las sinapsis funcionales generadas por la conversión de sinapsis silentes.....	43
5.2. La conversión de sinapsis silentes en funcionales subyace a ciertas formas de LTP	45
6. Mecanismos responsables de la inducción de la transformación de silentes en funcionales	46
V. DISCUSIÓN	49
1. Las propiedades de liberación son diferentes en las sinapsis funcionales y en las sinapsis silentes	51
2. Regulación de la liberación de neurotransmisor en las sinapsis silentes y funcionales..	54
3. Regulación colinérgica diferencial de la liberación de neurotransmisor: Implicaciones funcionales.....	56
4. Conversión de sinapsis silentes en funcionales	57
VI. CONCLUSIONES.....	61
VII. REFERENCIAS	63
VIII. FIGURAS.....	76

SUMMARY

Recent evidences suggest that functional and silent synapses are not only postsynaptically different but also presynaptically distinct. The presynaptic differences may be of functional importance in memory formation because a proposed mechanism for long-term potentiation (LTP) is the conversion of silent synapses into functional ones. However, there is little direct experimental evidence of these differences. We have investigated the transmitter release properties of functional and silent Schaffer Collateral (SC) synapses and show that on the average functional synapses displayed a lower percentage of failures and higher EPSC amplitudes than silent synapses at +60 mV. Moreover, functional but not silent synapses show paired-pulse facilitation (PPF) at +60 mV and thus, presynaptic short-term plasticity will be distinct in the two types of synapse. We examined whether intraterminal endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores influenced the release properties of these synapses. Ryanodine (100 μM) and thapsigargin (1 μM) increased the percentage of failures, and decreased both the EPSC amplitude and PPF in functional synapses. Caffeine (10 mM), had the opposite effects. In contrast, silent synapses were insensitive to both ryanodine and caffeine. Hence, we have identified differences in the release properties of functional and silent synapses, suggesting that synaptic terminals of functional synapses express regulatory molecular mechanisms that are absent in silent synapses.

A possible functional consequence of these results is that the conversion of silent into functional synapses with LTP should be paralleled by modifications of the release properties. We have investigated the presynaptic modifications associated with the postsynaptic insertion of AMPA receptors in silent synapses during LTP induced by pairing SC stimulation (1 Hz) with postsynaptic depolarization (+30 mV). We show that in a short period of time (< 30 min), these synapses: a) express AMPA mediated currents at the resting potential; b) display a significant increase in release probability; c) show a previously absent paired pulse facilitation, a presynaptic form of short-term plasticity; and d) acquire previously lacking sensitivity to manipulations that regulate release probability. These findings reveal that the conversion of silent synapses into functional ones with LTP is a complex process where both pre- and postsynaptic properties are modified, possibly by an unknown signal that translates the pre- and postsynaptic modifications. To test the induction site of LTP we analyzed the time course of the process of conversion, while blocking pre- or postsynaptic machineries. The results suggest that the presynaptic “unsilencing” is possibly triggered postsynaptically.

I. INTRODUCCIÓN

1. TRANSMISIÓN SINÁPTICA.

La transmisión de información y su regulación constituyen funciones fundamentales del sistema nervioso. Dicha transmisión de información se basa en la comunicación entre las neuronas, que se realiza fundamentalmente mediante la transmisión sináptica que es de naturaleza química en la mayoría de las sinapsis. Las moléculas responsables de la transmisión de información en las sinapsis químicas se denominan neurotransmisores. Los neurotransmisores pueden ser excitadores o inhibidores, se liberan desde unas estructuras especializadas denominadas terminales sinápticos en los cuales existen zonas activas donde se localiza la maquinaria molecular necesaria para producir la secreción exocitótica del neurotransmisor.

El término sinapsis, acuñado por Sherrington (1897) significa “sujetar juntos”, haciendo referencia, originalmente, a la región anatómica donde el terminal axónico de una neurona contacta con otra neurona, pero su significado ha ido ampliándose con el tiempo, incluyendo también contactos funcionales entre neuronas y efectores, y el contacto sobre las células musculares conocido como unión neuromuscular. La mayoría de nuestro conocimiento sobre la transmisión sináptica deriva del estudio de esta preparación, donde el neurotransmisor liberado es Acetilcolina (ACh), y los terminales del axon motor ocupan la “placa terminal” que es la región especializada en la membrana del músculo que forma pliegues. Opuesto a la cresta de cada pliegue, donde los receptores son más abundantes (Porter et al., 1973), el terminal axónico presenta bandas densas y vesículas sinápticas. Posteriormente se demostró que la apertura de las vesículas sinápticas (exocitosis) tiene lugar en los bordes de estas bandas, que fueron denominadas “zonas activas” (Couteaux, 1970a, b). Se considera que la “placa terminal motora” presenta múltiples unidades sinápticas, cada una de ellas representada por una banda densa con sus vesículas sinápticas, asociada a una densidad postsináptica (revisado en Peters et al., 1991). El equivalente a estas zonas activas en la unión neuromuscular de los crustáceos fue denominada “sitio de liberación” (revisado en Atwood, 1976) y ambos términos son utilizados indistintamente por los fisiólogos.

La liberación de neurotransmisor en el Sistema Nervioso Central (SNC) difiere de la unión neuromuscular debido a que presenta zonas de aposición más restringidas y la membrana postsináptica es lisa. Esto es, las sinapsis centrales constan de un elemento presináptico o “botón sináptico” que contiene vesículas sinápticas, y que está separado del elemento postsináptico por la “hendidura sináptica” ($\approx 10\text{-}20\text{ nm}$). La membrana plasmática en ambos lados presenta densidades marcadas (observadas con microscopía

electrónica), las cuales tomadas junto con la hendidura sináptica constituyen la unión sináptica, denominada “complejo sináptico” (Palay, 1958), que es el análogo de la zona activa de la unión neuromuscular.

En las sinapsis centrales, el aparato de liberación es la “parrilla presináptica” asociada a la membrana presináptica (Akert et al., 1972), que puede ser visualizada con microscopía electrónica de transmisión. Se piensa que la parrilla presináptica sirve para guiar a las vesículas sinápticas hacia la membrana plasmática. A pesar de las diferencias estructurales entre la “parrilla presináptica” de las sinapsis centrales y la zona activa de la unión neuromuscular ha habido una tendencia a equiparar las dos, y a usar el término “zona activa” para ambas estructuras.

En la membrana postsináptica se ha observado, mediante el uso de diferentes técnicas, la existencia de estructuras similares a las observadas en la unión neuromuscular, y por analogía se ha asumido que es el lugar de acumulación de receptores, hecho que posteriormente ha sido sobradamente demostrado (e.g Triller et al., 1985).

El avance de la investigación en los últimos tiempos ha permitido hacer descubrimientos tan importantes como la identificación de los terminales axónicos, así como numerosos aspectos de su estructura. Los terminales pueden variar en forma y tamaño y pueden contener una o más zonas activas; además el número y la geometría de las densidades presinápticas pueden exhibir una gran variedad de patrones (revisado en Sur et al., 1995).

Los datos obtenidos de la unión neuromuscular pueden servir como marco para una nomenclatura consistente basada tanto en la morfología como en la fisiología. La unidad funcional básica de la transmisión sináptica es un complejo que comprende la zona activa presináptica y las vesículas sinápticas próximas, junto con el agregado postsináptico que contiene los receptores operados por ligando. Esta sinapsis elemental corresponde al “complejo sináptico” (Palay, 1958, Peters et al., 1991) y es equivalente a la “unidad sináptica”, como fue definida primeramente en la unión neuromuscular por anatomistas y fisiólogos.

Junto con estos conceptos es necesario determinar cuantas unidades sinápticas están contenidas dentro de un botón sináptico formado por una neurona dada para llegar a conclusiones funcionales, ya que por ejemplo, diferentes botones no pueden ser considerados equivalentes *a priori* debido a que pueden contener diferente número de unidades sinápticas.

1.1. Liberación de neurotransmisor.

El estímulo para la liberación de neurotransmisor es la despolarización del terminal nervioso. La liberación ocurre como resultado de la entrada de Ca^{2+} en el terminal presináptico a través de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje y su posterior unión a sensores de Ca^{2+} , que desencadenan el proceso de liberación. Se ha demostrado la existencia de una relación no lineal entre la entrada de Ca^{2+} y la liberación de neurotransmisor (Dodge y Rahamimoff, 1967; Augustine et al., 1985). Los iones que entran a través de los canales dependientes de voltaje difunden una distancia variable, dependiendo del tipo de sinapsis, hasta alcanzar el sensor de Ca^{2+} para producir la liberación de una vesícula (Augustine et al., 2001).

Los neurotransmisores son liberados de los terminales nerviosos en paquetes cuánticos, esto es, como múltiplos de una unidad mínima denominada “*quantum*”. Esta noción está basada en el uso de modelos estadísticos que describen fluctuaciones en la transmisión sináptica a nivel de una conexión única.

Los modelos matemáticos empleados para el estudio de la transmisión sináptica incorporan dos términos presinápticos, que son la probabilidad de liberar un *quantum* (p) y el número de unidades disponibles (n), este último ha sido correlacionado con el número de sitios de liberación o zonas activas identificadas morfológicamente (Korn y Faber, 1987). Además, el tamaño del *quantum* (q) depende de factores pre y postsinápticos, como son el número de moléculas contenidas en un paquete, y la disponibilidad de los receptores, aunque habitualmente ha sido considerado un indicador postsináptico.

Tradicionalmente se ha considerado que un *quantum* de neurotransmisor corresponde al contenido de una vesícula sináptica (hipótesis vesicular), y comprende cientos de moléculas de transmisor de bajo peso molecular, aunque sigue abierto el debate sobre si un único sitio activo, en una sinapsis central, libera una única vesícula o libera más de una simultáneamente (Auger y Marty, 2000; Wadiche y Jahr, 2001; Christie y Jahr, 2006). Además tampoco existe acuerdo en cuanto al número de sitios activos presentes en un contacto sináptico, ya que en algunos casos, como por ejemplo, los terminales de las fibras musgosas en hipocampo, se han descrito terminales axónicos que contienen múltiples sitios de liberación. En casos como este se ha aceptado la teoría de la liberación de una vesícula por zona activa.

La liberación ocurre por un proceso de exocitosis, durante el cual la vesícula sináptica se fusiona con la membrana presináptica y el contenido de la(s) vesícula(s) es liberado en la hendidura sináptica. Los componentes de la membrana vesicular son

entonces recuperados por endocitosis, clasificados en endosomas, y reciclados para dar nuevas vesículas sinápticas.

Existe un grupo de vesículas que se encuentran ancladas en la zona activa que constituyen sólo una pequeña fracción del total de vesículas presentes en el terminal. Estas vesículas ancladas forman un conjunto morfológico que constituye el conjunto de vesículas listo para liberar (RRP, del inglés “ready releasable pool”). Existe además un conjunto de vesículas de reserva que se reclutan hacia la zona activa cuando se produce una estimulación mantenida. Por otra parte, existe otro grupo de vesículas que no pertenecen a ninguno de estos dos grupos, que se denomina *pool* de reposo o distal (Südhof, 2000). Se ha propuesto un modelo de función sináptica según el cual la probabilidad inicial de liberación dependería del tamaño del RRP (Dobrunz y Stevens, 1997), y se ha observado la existencia de correlación entre esta probabilidad y el tamaño del *pool* de vesículas (Murthy et al., 1997).

2. PLASTICIDAD SINÁPTICA.

La eficacia de la transmisión de una sinapsis no es rígida, sino que puede regularse en respuesta al flujo de información que existe en el SNC, mediante fenómenos de plasticidad sináptica, entendida como la capacidad de una sinapsis de cambiar su eficacia. Hay numerosos mecanismos subyacentes a la plasticidad sináptica como pueden ser tanto cambios en la liberación de neurotransmisor como cambios en la efectividad de las respuestas a la liberación de neurotransmisor. Tradicionalmente se ha considerado que la plasticidad sináptica podría ser la base celular de procesos de aprendizaje y memoria.

Existen múltiples formas de plasticidad sináptica y numerosos mecanismos implicados en cada una de ellas. Se han descrito fenómenos plásticos de corta duración en el tiempo (desde pocos milisegundos hasta decenas de segundos), denominados fenómenos de plasticidad a corto plazo (STP, del inglés “*short-term plasticity*”).

Entre los diversos tipos de STP cabe mencionar la **facilitación sináptica**, entendida como un aumento en la eficacia sináptica que ocurre en un segundo o menos y decae rápidamente. Este es un tipo de plasticidad que es mediada por mecanismos presinápticos, que ocurre cuando se produce la llegada consecutiva de dos o más potenciales de acción al terminal en un intervalo corto de tiempo, inferior a un segundo, se caracteriza porque la segunda respuesta sináptica (EPSC, del inglés “*excitatory postsynaptic current*”, o EPSP, del inglés “*excitatory postsynaptic potential*”) está aumentada con respecto a la primera. Este fenómeno también se conoce como **facilitación por pares de pulsos** (PPF, del inglés

“*paired pulse facilitation*”), y se ha demostrado que a medida que aumenta el intervalo entre los dos potenciales de acción decae la magnitud de esta facilitación (Dobrunz y Stevens, 1997; Dobrunz et al., 1997).

La PPF es causada principalmente por un incremento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor, ligado al incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular que se produce tras la llegada del primer potencial de acción, que puede permanecer durante un tiempo suficiente para coincidir con la entrada de Ca^{2+} generada por el siguiente potencial de acción (Creager et al., 1980; Dobrunz y Stevens, 1997; Hanse y Gustafsson, 2001a; 2001b; 2001c; de Sevilla et al., 2002; Zucker y Regehr, 2002).

También se han descrito fenómenos de plasticidad sináptica perdurables en el tiempo (desde minutos hasta horas o días) que se conocen como plasticidad a largo plazo, que pueden ser fenómenos en los que la eficacia sináptica se ve aumentada, denominándose **potenciación a largo plazo** (LTP, del inglés “*long-term potentiation*”), o en algunos casos esta eficacia se ve disminuida, y en este caso ha denominado **depresión a largo plazo** (LTD, del inglés “*long-term depression*”).

El estudio de estos fenómenos de plasticidad ha suscitado gran interés durante los últimos 40 años. Actualmente se sabe que la LTP y LTD de la transmisión sináptica excitadora son fenómenos expresados en la mayoría de las sinapsis excitadoras en el cerebro de mamíferos, y que los mecanismos responsables de estos fenómenos varían dependiendo de la sinapsis y del circuito en el que esté inmersa esta sinapsis (revisado en Malinow et al., 2000; Nicoll, 2003; Lisman, 2003; Kullmann, 2003; Malenka y Bear, 2004).

A pesar de la enorme cantidad de trabajos de investigación realizados para esclarecer los mecanismos de LTP y LTD, sigue habiendo ciertas discrepancias en cuanto a la localización presináptica o postsináptica de los fenómenos responsables tanto de su inducción como de su expresión.

Durante la década de 1980 se realizaron numerosos estudios tratando de esclarecer los mecanismos responsables de la inducción de la LTP. Estos estudios demostraron que: se requiere la activación de los receptores de glutamato de tipo NMDA (N-methyl-D-aspartato) (Collingridge et al., 1983), es necesario un incremento en el Ca^{2+} postsináptico (Lynch et al., 1983), y además es necesaria la despolarización de la célula postsináptica (Malinow y Millar, 1986). Conjuntamente también se encontró que el receptor de NMDA presenta un bloqueo por Mg^{2+} extracelular dependiente de voltaje (Nowak et al., 1984) y que este receptor es altamente permeable a Ca^{2+} (MacDermott et al., 1986; Jahr y Stevens,

1987). Basándose en estas observaciones se planteó un modelo postsináptico de inducción de la LTP, en el cual la activación de los receptores NMDA acoplada a una fuerte despolarización postsináptica, causaba un incremento en la concentración de Ca^{2+} en la espina postsináptica y este aumento iniciaba una serie de pasos que resultaban en el incremento persistente en la transmisión sináptica.

Anteriormente se habían encontrado también evidencias de que durante la LTP se producían incrementos en la cantidad de glutamato extracelular posiblemente causado por un aumento de la liberación (Dolphin et al., 1982). Dado que la inducción de la LTP parecía claramente postsináptica este resultado implicaba la existencia de un mensajero retrogrado que todavía no ha sido identificado.

Posteriormente otros estudios concluyeron que la LTP se expresaba de manera presináptica (Malinow y Tsien, 1990; Bekkers y Stevens, 1990) basándose en el análisis del coeficiente de variación (CV) y del porcentaje de fallos en la transmisión (estimación de la probabilidad de liberación). Estos resultados fueron posteriormente confirmados por otros grupos (Manabe et al., 1993; Kullmann y Nicoll, 1992).

Por tanto, a pesar de la gran cantidad de estudios realizados aún no se ha llegado a un acuerdo en cuanto a la localización de la expresión de la LTP.

La aplicación del análisis cuántico a la transmisión sináptica contribuye a clarificar los mecanismos subyacentes a los cambios en la eficacia sináptica que ocurren durante la maduración y el aprendizaje. Usando este tipo de análisis para diferenciar entre el tamaño cuántico (q), y el contenido cuántico ($m=n \cdot p$), podría ser posible, en teoría, identificar si los mecanismos que producen los cambios en la eficacia sináptica son pre o postsinápticos, y esto facilitaría la identificación de los procesos moleculares implicados.

3. TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN HIPOCAMPO.

El hipocampo es una de las estructuras corticales mejor caracterizada en el SNC de los mamíferos. Es una estructura cilíndrica cuyo eje longitudinal forma un semicírculo alrededor del tálamo. Se subdivide en hipocampo propiamente dicho, o Asta de Amón, giro dentado y complejo subicular.

El hipocampo se clasifica dentro del cortex de asociación supramodal porque la mayoría de las proyecciones de la corteza que recibe son procedentes de áreas de asociación polimodal. Son abundantes los aferentes de la corteza entorrinal, la región septal, la banda diagonal de Broca (Lewis y Shute, 1967; Pasquier y Reinoso-Suárez, 1978) y del hipocampo contralateral. También son evidentes, pero menos numerosas, las

aferencias del hipotálamo, tálamo, amígdala, locus cerúleo, núcleos del rafe, área tegmental ventral y cuerpos mamilares. A su vez, el hipocampo proyecta sobre muchas de las regiones que lo inervan, como, por ejemplo, el núcleo lateral del complejo septal, los cuerpos mamilares, el núcleo ventromedial del hipotálamo y el tálamo anterior.

El estudio de la formación del hipocampo ha despertado la atención de los neurocientíficos por diversas razones. Entre ellas su peculiar estructura, altamente organizada, la facilidad que presenta para su estudio electrofisiológico tanto *in vivo* como *in vitro*, y su implicación en los procesos mnésicos como se deduce de los estudios realizados en el hombre tras su lesión por procesos degenerativos, vasculares o quirúrgicos.

Las neuronas principales en el giro dentado son las células granulares, y en el hipocampo (Asta de Amón) son las neuronas piramidales. El asta de Amón ha sido dividido en tres regiones denominadas CA1-CA3 (Lorente de Nó, 1934), basándose en el tamaño y apariencia de las neuronas. Los cuerpos celulares de las neuronas piramidales del hipocampo están colocados a lo largo de una ordenada capa denominada Capa Celular Piramidal. Estas neuronas tienen elaborados árboles dendríticos que se extienden perpendicularmente a la capa celular en ambas direcciones. Las dendritas apicales son más largas que las basales y se extienden desde el ápice del cuerpo de la célula piramidal hasta el centro del hipocampo, por ejemplo, la dendrita apical de las células piramidales de CA3 atraviesan tres estratos: *stratum lucidum*, *stratum radiatum*, y *stratum lacunosum-moleculare*. Las dendritas reciben diferentes tipos de contactos sinápticos en cada uno de estos estratos. Las dendritas basales se extienden desde la base del cuerpo de la célula piramidal hacia el *stratum oriens*.

El circuito básico de la formación hipocampal se conoce desde el tiempo de Ramón y Cajal (1911), a pesar de que los detalles aportados por neuroanatomistas han contribuido a su conocimiento actual. Andersen y colaboradores (1971) enfatizaron en la progresión unidireccional de las vías excitadoras que unen cada región hipocampal y acuñaron el término “circuito trisináptico”. Por simplicidad, el cortex entorrinal es considerado el punto de comienzo del circuito, debido a que la mayoría de la información sensorial que llega al hipocampo lo hace a través de esta zona.

El principal neurotransmisor excitador en el hipocampo es el glutamato (Roberts et al., 1981; Storm-Mathisen, 1977). El glutamato es liberado desde la vía perforante, las fibras musgosas, fibras comisurales-asociativas y las Colaterales de Schaffer (CS). El glutamato actúa principalmente sobre dos tipos de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos (Hicks et al., 1987). Los receptores ionotrópicos abren directamente

canales iónicos que forman parte del receptor, mientras que los receptores metabotrópicos median sus acciones a través de proteínas G, que bien abren o cierran canales iónicos, o activan cascadas de segundos mensajeros. En cada clase de receptores existen además distintas familias, dentro de las cuales hay una gran variedad de moléculas receptoras.

Los receptores ionotrópicos de glutamato son principalmente los receptores tipo AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionato), Kainato y NMDA, llamados así por el ligando específico utilizado para su caracterización. Los receptores de tipo AMPA y Kainato median los EPSCs rápidos, mientras los de tipo NMDA median el componente lento.

Todos los receptores ionotrópicos de glutamato abren canales que son no-selectivos para los cationes monovalentes Na^+ y K^+ . Algunos de los receptores de tipo AMPA y Kainato y todos los de tipo NMDA son también permeables a Ca^{2+} . Además de esta característica, los receptores de tipo NMDA son también dependientes de voltaje, debido a que en potenciales cercanos al de reposo el canal está bloqueado por Mg^{2+} extracelular, y cuando la membrana se despolariza el canal se desbloquea, permitiendo así el flujo de iones a través del canal. El receptor NMDA (NMDAR) juega un papel importante en la inducción de ciertas formas de plasticidad a largo plazo (LTP) (Collingridge y Watkins, 1994).

Otro neurotransmisor excitador también importante en el hipocampo es acetilcolina (ACh), ya que el hipocampo recibe proyecciones difusas de fibras colinérgicas que se originan en el núcleo medial septal y en la banda diagonal de Broca (Lewis y Shute, 1967; Frotscher y Lernath, 1985; Alonso y Amaral, 1995; Dutar et al., 1995). Al igual que el glutamato, ACh actúa sobre receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos de ACh, son los receptores nicotínicos, y los metabotrópicos son los receptores muscarínicos. En el hipocampo se ha descrito la presencia de receptores muscarínicos tanto a nivel presináptico como postsináptico (Williams y Johnston, 1993).

En todas las vías excitadoras del hipocampo hay diferentes combinaciones de estos tipos de receptores, existiendo incluso variaciones a nivel de una única sinapsis, tal y como sucede en las sinapsis excitadoras mediadas por glutamato entre las CS y las neuronas piramidales de CA1, donde se han descrito dos tipos de sinapsis glutamatérgicas en función del tipo de receptor presente en la densidad postsináptica: sinapsis silentes y sinapsis funcionales. Tradicionalmente se han considerado sinapsis silentes aquellas que no poseen receptores de tipo no-NMDA, es decir, sólo presentan corriente mediada por receptores de tipo NMDA (Fig. 1). Estas sinapsis no responden cuando el potencial de

membrana (V_m) es cercano al V_m en reposo (-65 mV aproximadamente, en neuronas piramidales de CA1), pero muestran corrientes excitadoras postsinápticas (EPSCs) sensibles al ácido DL-2-amino-5-fosfovalérico (APV) cuando la neurona es despolarizada. Este comportamiento se debe a que estas sinapsis sólo contienen NMDARs, que se encuentran bloqueados por el Mg^{2+} extracelular al V_m en reposo, y que se desbloquean cuando la neurona se despolariza. Por el contrario, las sinapsis funcionales son aquellas que poseen receptores NMDA y no-NMDA operativos (Fig. 1), y responden tanto a V_m en reposo como cuando la neurona es despolarizada (Durand, et al., 1996; Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995).

Existen además otras hipótesis que apuntan hacia una diferencia presináptica entre ambos tipos de sinapsis, como la que se deriva del modelo de “spillover”, que explica la existencia de las sinapsis silentes como consecuencia de la mayor afinidad de los receptores NMDA frente a los no-NMDA por el glutamato. Este neurotransmisor puede difundir entre sinapsis vecinas, en las sinapsis silentes el glutamato alcanzaría concentraciones bajas que podrían activar selectivamente los receptores NMDA, que presenta mayor afinidad por glutamato que los receptores de tipo AMPA (Kullmann y Asztely, 1998).

Otra de las teorías, que apuntan hacia la naturaleza presináptica de las sinapsis silentes, es aquella que argumenta que estas sinapsis presentan los dos tipos de receptores (NMDA y no-NMDA) en la densidad postsináptica, pero el terminal presenta una baja probabilidad de liberación y/o la concentración de glutamato que se alcanza en la hendidura sináptica es insuficiente para activar los receptores no-NMDA (Choi et al., 2000; Gasparini et al., 2000; Voronin y Cherubini, 2004).

Por otro lado, evidencias recientes sugieren que las sinapsis silentes y funcionales pueden presentar diferencias tanto presinápticas como postsinápticas. De hecho, se ha demostrado que los agonistas colinérgicos inhiben presinápticamente las sinapsis funcionales, pero no afectan a las sinapsis silentes (de Sevilla et al., 2002; Cabezas y Buño, 2006). Además, la dinámica de liberación de las sinapsis que expresan solo receptores NMDA y aquellas que expresan ambos tipos de receptores son diferentes (Poncer y Malinow, 2001). Sin embargo, mientras se ha sugerido que la dinámica de la concentración de Ca^{2+} en el terminal presináptico puede ser importante, los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a las diferencias funcionales entre ambos tipos de sinapsis glutamatérgicas permanecen desconocidos (Becherer et al., 2003; Renger et al., 2001; Saviane et al., 2002; Atwood y Wojtowicz, 1999).

El análisis de las diferencias en la liberación de neurotransmisor y su regulación en las sinapsis silentes y funcionales tiene gran relevancia fisiológica. Estas diferencias pueden contribuir a la plasticidad sináptica implicada en los procesos de aprendizaje y memoria, donde la transformación bidireccional de sinapsis silentes en funcionales es extremadamente importante (Anagnostaras et al., 2003; Durand et al., 1996; Goda y Stevens, 1996; Hasselmo, 1999; Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995; Poncer y Malinow, 2001; Xiao et al., 2004; Atwood y Wojtowicz, 1999; Isaac, 2003; Nicoll, 2003).

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GENERALES.

Las sinapsis glutamatérgicas, formadas por las CS y las neuronas piramidales de CA1, representan un modelo clásico de estudio de los fenómenos de plasticidad sináptica (LTP y LTD), que se cree subyacen a los procesos de memoria y aprendizaje. Uno de los fenómenos que parece ser importante en estos procesos de plasticidad es la transformación bidireccional de las sinapsis silentes en sinapsis funcionales.

Dada la controversia existente acerca del origen pre o postsináptico de las diferencias entre las sinapsis silentes y funcionales, el presente trabajo de investigación abordará su estudio, analizando las propiedades y mecanismos subyacentes a la liberación de neurotransmisor en ambos tipos de sinapsis glutamatérgicas así como las posibles diferencias entre ellas, y las posibles consecuencias funcionales de estas diferencias y su implicación en fenómenos de plasticidad sináptica como la STP y la LTP.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1.- En consecuencia, el primer objetivo específico planteado en el presente trabajo de investigación es el **estudio de las diferencias en las propiedades de liberación de neurotransmisor en las sinapsis silentes y funcionales en hipocampo de rata.**

2.- Para poder llevar a cabo este objetivo tuvimos que estudiar los **mecanismos responsables de la liberación de neurotransmisor en los terminales de las Colaterales de Schaffer, y su regulación.**

3.- Una vez establecidas las diferencias en las propiedades de liberación entre ambos tipos de sinapsis nos planteamos **el análisis del cambio en las propiedades de liberación durante la transformación de sinapsis silentes en funcionales.**

4.- por último tras observar si las propiedades presinápticas también se modifican durante la conversión el siguiente estudio que se plantea es el estudio de **los mecanismos responsables de la inducción de la transformación de sinapsis silentes en funcionales.**

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PREPARACIÓN Y REGISTROS.

1.1. Obtención de las rodajas de hipocampo de rata:

Se utilizaron rodajas de hipocampo obtenidas a partir de ratas Wistar (11-16 días de edad). Las ratas fueron decapitadas y el encéfalo fue extraído y sumergido en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF, ver apartado 1.4) a una temperatura de $\approx 4^{\circ}\text{C}$. Una vez extraído el tejido se realizaron secciones transversales de 300-400 μm de espesor con el vibrátomo (Pelco, 101, Series 1000, St. Louis, MO, USA). Las rodajas así obtenidas se mantuvieron incubando un mínimo de 60 minutos en ACSF, burbujeado permanentemente con carbógeno (95% O_2 - 5% CO_2), a temperatura ambiente (20-22°C) en oscuridad.

Las rodajas fueron transferidas a una cámara de registro (para rodajas sumergidas, con un volumen de 2-3 ml) situada en un microscopio Olympus BS50WI (Olympus Optical, Tokio, Japan) equipado con contraste diferencial de infrarrojo y sistema de Nomarski, donde fueron mantenidas a temperatura ambiente y constantemente perfundidas, a una velocidad de 1-10 ml/min, con ACSF modificado (ver apartado 1.4) y oxigenado permanentemente con carbógeno (95% O_2 - 5% CO_2). La renovación total de las distintas soluciones usadas (ver 1.4) en la cámara se realiza en ≈ 3 minutos a la velocidad más alta de perfusión.

1.2. Técnicas de registro.

Una vez situada la rodaja en la cámara de registro se realizaron registros electrofisiológicos, bajo visualización directa, de las neuronas piramidales de CA1 de hipocampo (Fig. 2A, B), con la técnica de “Patch-Clamp” en la configuración de “Célula Entera”, en la modalidad de “Fijación de Voltaje” (con el objeto de medir los cambios producidos en las corrientes iónicas transmembrana). Para ello se utilizaron electrodos de registro formados por un alambre de plata clorurada (Ag/AgCl) incluido en una micropipeta de borosilicato con capilar interno (OD-ID: 1.5-0.86 mm; Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA) que fueron estiradas con un estirador de pipetas (Model P-80, Sutter Instrument Co.) y rellenadas con la solución intracelular (ver 1.4). Los electrodos de registro presentaron una resistencia de 3-8 $\text{M}\Omega$. Los electrodos de registro se conectaron a un amplificador PC-ONE Patch-Clamp (Dagan Corporation, Minneapolis, MN, USA), conectado a su vez a un ordenador (PC) a través de un conversor analógico-digital (DigiData 1200B, Axon Instruments). Las capacitancias lentas y rápidas fueron neutralizadas y la resistencia en serie fue compensada ($\approx 80\%$). Los registros fueron rechazados si la resistencia de acceso (7-15 $\text{M}\Omega$) cambió $> 20\%$ durante el experimento. El

conjunto de programas pCLAMP 8 (Axon Instruments) fue utilizado, tanto para la generación de las señales de estimulación, como para el registro de las respuestas de las células y el posterior análisis de los resultados.

Con el objeto de registrar sinapsis únicas, diferenciando las sinapsis silentes de las funcionales, los registros electrofisiológicos se realizaron manteniendo la neurona a dos potenciales de membrana (V_m): -60 mV y +60 mV, donde el receptor de NMDA se encuentra bloqueado o no por el Mg^{2+} extracelular (Liao et al., 1995).

1.3. Identificación de las neuronas piramidales de la región de CA1

Los registros electrofisiológicos se obtuvieron bajo visualización directa de las neuronas piramidales de la región de CA1 del hipocampo (Fig. 2B). Para ello se utilizó un sistema de contraste diferencial de infrarrojo y sistema de Nomarski, conectado a una cámara digital (CCD, Modelo SSC-M257CE, Sony Corporation, Japón), que permitía la observación directa de la región de CA1 y la identificación de las neuronas piramidales por sus características morfológicas: cuerpo celular o “soma” con forma triangular o de pirámide, con $\approx 30 \mu m$ de longitud de su eje mayor, presentando en el extremo apical una única dendrita de gran calibre que posteriormente da lugar al penacho apical, y en la base del soma aparecen proyectándose de forma radial las dendritas basales.

Además de estas características morfológicas también se analizaron las propiedades intrínsecas de los distintos tipos celulares para la correcta identificación de las neuronas piramidales. Una de las características de las neuronas piramidales es que frente a la inyección de pulsos rectangulares de corriente despolarizante muestran un comportamiento caracterizado por el disparo de potenciales de acción con adaptación en frecuencia, comportamiento que no está presente en otros tipos neuronales como son las interneuronas, lo que permite descartar aquellas neuronas que no cumplen todos estos requisitos.

1.4. Soluciones de Registro

Para caracterizar las corrientes sinápticas glutamatérgicas, evocadas por estimulación “mínima” (ver apartado 2.1) de las CS, se eliminaron tanto los componentes inhibitorios mediados por receptores del ácido γ -amino-n-butírico (GABA) tipo A ($GABAR_A$, receptor ionotrópico involucrado en la transmisión rápida inhibitoria) presentes en la membrana citoplasmática de las neuronas piramidales de CA1, así como parte de las corrientes de membrana que determinan sus propiedades intrínsecas. Para ello se utilizaron distintas soluciones extra e intracelulares. El pH de estas soluciones fue ajustado a 7.3, utilizando

NaOH o KCl, para las soluciones extracelulares y CsOH para la solución intracelular. Del mismo modo la osmolaridad de las soluciones fue medida y ajustada con sacarosa a valores comprendidos entre 280-290 mOsm/l, para la solución intracelular, y entre 300-310 mOsm/l para las soluciones extracelulares. A continuación se detalla la composición de las diferentes disoluciones utilizadas:

El ACSF “control” utilizado para la obtención y mantenimiento de las rodajas contenía (en mM): 124.0 NaCl, 2.7 KCl, 1.25 KH_2PO_4 , 2.0 MgSO_4 , 26.0 NaHCO_3 , 2.0 CaCl_2 y 10.0 glucosa. El ACSF “modificado”, utilizado para la perfusión de las rodajas durante el desarrollo de todos los experimentos, contenía (en mM): 119.0 NaCl, 2.5 KCl, 1.0 KH_2PO_4 , 1.3 MgSO_4 , 26.2 NaHCO_3 , 2.5 CaCl_2 , 30.0 sacarosa, 0.05 picrotoxina (bloqueante de los receptores de GABA tipo A), 0.01 glicina y 11.0 glucosa.

La solución intracelular contenía: (en mM): 107.5 Cs-gluconato, 8.0 NaCl, 0.2 EGTA, 20.0 HEPES, 10.0 TEA-Cl, 4.0 Mg-ATP y 0.3 GTP. En el caso del estudio de la conversión de sinapsis silentes en funcionales la solución intracelular utilizada fue igual que la anterior pero sin EGTA, ya que los fenómenos de plasticidad están mediados por el influjo de Ca^{2+} que entra por los receptores NMDA, y EGTA secuestra el Ca^{2+} entrante.

Se utilizaron además, diferentes drogas para estudiar las propiedades de la liberación de neurotransmisor, que se añadieron a la solución extracelular. Algunas de estas sustancias fueron aplicadas mediante perfusión, como carbacol (CCh, 5 μM), ryanodina (50 y 100 μM) y thapsigargina (1 μM), mientras que la cafeína (10 mM) fue aplicada directamente en el baño a través de una micropipeta (diámetro de la punta: 400 μm) colocada cerca de la posición del electrodo de registro mediante un micromanipulador (Martín y Buño, 2003). Los componentes NMDA y no-NMDA de los EPSCs fueron aislados utilizando los antagonistas: ácido DL-2-amino-5-fosfovalérico (APV, 50 μM) y 6-ciano-7-nitroquinoxalina-diona (CNQX, 20 μM).

Para el análisis de la conversión de sinapsis silentes en sinapsis funcionales se utilizaron también distintas sustancias, como APV (50 μM) que inhibe los receptores NMDA e impide la entrada de Ca^{2+} , para el bloqueo de la CaMKII, se añadió a la solución intracelular el inhibidor de la CaMKII 281-309 (10 μM). También estudiamos el efecto del quelante de Ca^{2+} ácido 1,2-Bis(2-aminophenoso)ethane-N,N,N',N'-tetraacético sal de tetracesio (BAPTA) (50 mM) añadido a la solución intracelular para bloquear el aumento de Ca^{2+} intracelular.

Cafeína, CCh, APV y 281-309 fueron disueltas en agua, mientras ryanodina y thapsigargina fueron disueltas en DMSO (0.01%). DMSO a la concentración utilizada no

tuvo efectos sobre las respuestas sinápticas y tampoco sobre las conductancias postsinápticas (n=3). Las sales y las drogas fueron obtenidas de Sigma-Aldrich Quimica (Madrid, España), Tocris (Avonmouth, Reino Unido), y Calbiochem (Darmstadt, Alemania).

2. ESTIMULACIÓN SINÁPTICA.

2.1. Estimulación “mínima”

Para estudiar las conexiones sinápticas entre las CS y las neuronas de CA1 se empleó un protocolo de estimulación “mínima”, que estimula una o muy pocas sinapsis (Raastad, 1995), usando dos electrodos de Ag/AgCl, conectados a una unidad de aislamiento (ISU 165, Cibertec, Madrid, España), situados en los compartimentos de una pipeta estirada del mismo modo que los electrodos de patch usando capilares septados (\varnothing de la punta \approx 3-5 μm ; TST 150-6, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA). La pipeta (rellenada con ACSF modificado, ver 1.4) fue movida a través del el *stratum radiatum* bajo visualización directa, cercano a la dendrita apical (\leq 100 μm del soma; Fig. 2B) de la célula registrada, y fijada cuando un único aferente era estimulado. No hubo diferencias en la localización del electrodo de estimulación a lo largo de las dendritas para las sinapsis silentes y funcionales. Solamente se analizó una sinapsis en cada neurona registrada. La estimulación se realizó con pulsos únicos (300 μs de duración) a 1.0 s^{-1} , o con pares de pulsos separados por intervalos de 50 ms (excepto cuando se indica lo contrario) y repetidos a una frecuencia de 0.5 s^{-1} como protocolo para el estudio de la facilitación por pares de pulsos (PPF) y en algunos casos (n=6) de 0.1 s^{-1} . No se encontraron diferencias en el comportamiento de las sinapsis silentes y funcionales frente a las distintas frecuencias de estimulación. Los diferentes protocolos de estimulación fueron generados por el programa pCLAMP 8 conectado a la unidad de aislamiento Cibertec. Para detectar las sinapsis silentes la célula fue despolarizada a +60 mV y después fue mantenida a -60 mV durante al menos 5 min antes de empezar a analizar las propiedades de las sinapsis silentes a +60 mV. El umbral de la intensidad de estimulación necesaria para evocar EPSCs unitarios fue determinado a -60 mV para las sinapsis funcionales y a +60 mV para las sinapsis silentes. Con los valores del pico del EPSC promedio (100 trazos sucesivos incluyendo fallos) obtenidos con intensidades de estimulación crecientes se construyeron relaciones estímulo-respuesta (Fig. 2C) Las amplitudes del EPSC promedio fueron estables hasta que se observó un salto en la amplitud del EPSC (sugiriendo el reclutamiento de aferentes adicionales); esto ocurrió normalmente a intensidades de estimulación entre 150 y 300 %

del umbral inicial de intensidad. La intensidad de estimulación fue entonces disminuida hasta un 25%-50% sobre el umbral inicial y se comprobó cuidadosamente que durante la duración del experimento no se produjesen cambios tanto en la amplitud de los EPSCs como en el porcentaje de fallos (ver apartado 3).

Estos procedimientos minimizan la posible activación de más de un aferente o de fallos en la activación del axon estimulado. Las sinapsis que no mostraron estabilidad en la amplitud de los EPSCs promedio durante el experimento fueron excluidas del análisis. Nótese que no se encontraron diferencias significativas en el umbral de intensidad de estimulación entre las sinapsis silentes y funcionales, indicando que no hay diferencias entre la excitabilidad axónica de ambos tipos de sinapsis. El experimento comenzó realizando 100 estimulaciones sucesivas (pulsos simples o pares de pulsos). Cuando se estudió una posible sinapsis silente se realizaron 100 estímulos a -60 mV para verificar que la sinapsis era realmente silente y que no había cambios en sus propiedades. Se consideró una sinapsis como silente cuando respondía exclusivamente a +60 mV, y no respondía a -60 mV, incluso con los protocolos de pares de pulsos. Por tanto, una pequeña proporción de sinapsis que a -60 mV no respondían al estímulo pero si respondían al segundo estímulo con un probabilidad baja (i.e., “mute synapses”; Hanse y Gustafsson, 2001a; Gasparini et al., 2000; revisado en Voronin y Cherubini, 2004) fueron excluidas del análisis. Para el análisis de las sinapsis funcionales se utilizó prácticamente el mismo procedimiento, pero la estimulación fue primero manteniendo la célula a -60 mV y después fue despolarizada a +60 mV (100 estímulos en cada caso). Debe notarse que la intensidad de estimulación (≈ 10 -50 mA) no fue modificada durante ninguno de los experimentos incluidos en el estudio. En todos estos experimentos, para minimizar la contribución de posibles mecanismos postsinápticos de plasticidad, se esperaron al menos 20-30 minutos (Malinow y Tsien, 1990), tras haber obtenido acceso al interior celular, para comenzar con los protocolos de estimulación y de identificación de los distintos tipos de sinapsis. Al final del experimento, tanto para las sinapsis silentes como para las sinapsis funcionales, la intensidad de estimulación fue de nuevo modificada para verificar si durante el experimento habían ocurrido cambios en el umbral de estimulación o en la estabilidad de la amplitud de los EPSCs unitarios. Estas pruebas también indican la ausencia de fenómenos de plasticidad a largo plazo como LTP y LTD. En muchos casos (35/85) se analizaron los efectos de añadir CCh (5 μ M) al ACSF modificado al final del experimento, lo que permitió una identificación segura del tipo de sinapsis que estaba siendo registrada debido a que CCh no tiene efecto sobre las sinapsis silentes pero inhibe las sinapsis funcionales

(de Sevilla et al., 2002). Estos controles fueron utilizados para reducir la posibilidad de estar estimulando más de una fibra de las CS (Raastad, 1995). Las sinapsis que no cumplieron estos criterios fueron excluidas del análisis.

2.2. Apareamiento de estimulación con despolarización postsináptica.

Para el estudio de la conversión de las sinapsis silentes en funcionales se realizó un protocolo similar al descrito anteriormente en cuanto a la identificación del tipo de sinapsis. En este caso solamente se esperaron 5 minutos, tras el acceso al interior celular, antes de comenzar con el proceso de identificación de sinapsis silentes, para impedir la dialización del contenido intracelular, que produjese el lavado completo de la maquinaria postsináptica necesario para la inducción de LTP. Una vez identificadas las sinapsis silentes se procedió a realizar el protocolo de potenciación (similar al descrito anteriormente por otros autores, Isaac et al. 1995, y Liao et al. 1995). Se llevaron las células a un V_m despolarizado (+30 mV) a la vez que se aumentó la frecuencia de estimulación, pasando de 0.5 s^{-1} a 1 s^{-1} durante un tiempo de 10 a 15 min, y posteriormente se llevo a la célula a -60 mV para comprobar la posible aparición de respuestas a este potencial de membrana indicativo de la inserción de receptores AMPA y por tanto de la conversión de sinapsis silentes en funcionales. Una vez convertidas las sinapsis el protocolo para analizar las características de estas sinapsis funcionales recién creadas fue el mismo que el descrito anteriormente, manteniendo la célula alternativamente a -60 y +60 mV y estimulando a una frecuencia de 0.5 s^{-1} hasta la finalización del experimento.

2.3. Estimulación Convencional

Para el estudio la respuesta de las neuronas piramidales a la estimulación de un grupo de aferentes, se utilizó un protocolo de estimulación convencional. Para ello el sistema utilizado fue (al igual que en el caso de la estimulación “mínima”) estimulación bipolar con dos electrodos de Ag/AgCl conectados a una unidad de aislamiento (ISU 165, Cibertec, Madrid, España) y situados en el interior de un capilar de vidrio septado estirado de igual manera que los electrodos de patch, pero en este caso el diámetro de la punta obtenida fue mayor, siendo $\approx 20\text{ }\mu\text{m}$, para permitir un mayor flujo de corriente a través de los dos electrodos, y por tanto estimular mayor número de fibras. Se escogió la polaridad adecuada de los electrodos, a fin de obtener una respuesta sináptica óptima para una determinada intensidad de estimulación. La estimulación se realizó con pares de pulsos (300 μs duración, cada uno de ellos) separados por intervalos de 50 ms y repetidos a una

frecuencia de 0.5 s^{-1} como protocolo para el estudio de la facilitación por pares de pulsos (PPF).

3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

Para el análisis de los registros se utilizó el conjunto de programas denominado “pCLAMP 8” (Axon Instruments, Inc) y en particular el programa “Clampfit”. Para la representación de las gráficas se utilizó el programa de ordenador “Sigmaplot” (versión 8.0.2 para “Windows”, SPSS Inc).

Los parámetros que se analizaron son los que se describen a continuación:

1. Eficacia Sináptica: amplitud del pico del EPSC promedio, obtenida del promedio de las respuestas a todos los estímulos, incluyendo aciertos y fallos (Fig. 3A).

2. Potencia Sináptica (PS): amplitud de pico del promedio del EPSC cuando la transmisión sináptica es efectiva (cuando los fallos son excluidos; Stevens y Wang 1994; Fig. 3B).

3. Probabilidad de Liberación (Pr): cuantificada mediante el estudio del porcentaje de fallos (ocasiones en las que la transmisión sináptica no es efectiva), entendido como: $100 - [(n^\circ \text{ EPSCs} \times 100)/n^\circ \text{ estímulos}]$.

4. Índice de Facilitación por Pares de Pulsos (IPPF): se calcula a partir de la eficacia sináptica: $(R2-R1)/R1$, donde R1 y R2 corresponden a la eficacia sináptica de el 1º EPSC y 2º EPSC, respectivamente (Fig. 3A).

5. Índice de Potencia Sináptica (IPS): se calcula a partir de la potencia sináptica: $(R2-R1)/R1$, siendo R1 y R2 la potencia sináptica del 1º y 2º EPSC respectivamente.

6. Coeficiente de variación libre de ruido (CV_{NF}): se calcula a partir de la ecuación:

$$CV_{NF} = (\sqrt{\delta^2_{EPSC} - \delta^2_{noise}})/m$$

donde δ^2_{EPSC} y δ^2_{noise} son la varianza del pico de amplitud del EPSC y de la línea base (ruido) y m es el valor medio del pico de amplitud del EPSC, respectivamente (Bekkers y Stevens, 1990; Malinow y Tsien, 1990; de Sevilla et al., 2002).

Para el análisis de los fallos se utilizaron aquellas células que mostraron una separación clara de los EPSCs con respecto al ruido, de manera que permitió la discriminación visual entre un acierto y un fallo. Además, los fallos seleccionados fueron promediados (Fig. 3B) y la selección visual fue excluida si el promedio de los fallos contenía deflexiones post-estímulo con un curso similar al observado en los aciertos,

estimadas como estadísticamente significativas ($P < 0.05$) frente a la amplitud del ruido (medido 10-15 s antes del primer artefacto de estimulación).

Durante la estimulación a -60 mV la amplitud del EPSC fue definida como la diferencia entre el pico del EPSC promediado y la línea base precedente. Con la estimulación a +60 mV, para poder comparar la potencia sináptica de las sinapsis silentes con las funcionales, se estimó la amplitud del componente NMDA. Durante la estimulación con pares de pulsos el pico de amplitud del primer EPSC (R1) fue estimado de igual manera que a -60 mV, mientras que el pico de amplitud del segundo EPSC (R2) fue estimado como la diferencia entre la amplitud del componente NMDA y el ajuste exponencial de la fase de descenso del precedente R1 (Fig. 3A).

La estimación de la amplitud del componente NMDA en ambos tipos de sinapsis fue estimada midiendo a 30 ms del artefacto de estimulación, donde a +60 mV el componente AMPA no contribuye y solo hay componente NMDA. Para confirmar que el componente AMPA ha finalizado a los 30 ms, se analizaron siete sinapsis funcionales en ACSF modificado y después de aislar el componente AMPA perfundiendo APV (50 μ M) para bloquear el componente NMDA. Encontramos que en estas sinapsis el pico de amplitud del EPSC compuesto (AMPA + NMDA) no diferían del resto de sinapsis funcionales analizadas, por tanto estas sinapsis eran una muestra representativa de las sinapsis funcionales incluidas en el estudio. En estas sinapsis el componente AMPA aislado presentó el pico máximo a 3.0 ± 0.4 ms y finalizó a 27.5 ± 0.8 ms, confirmando que la medida a los 30 ms solo correspondía al componente NMDA (Fig. 3C).

El CV_{NF} de las respuestas sinápticas fue calculado tanto para el EPSC promedio (incluyendo fallos y aciertos) como para la potencia sináptica (cuando los fallos son excluidos). La inversa del cuadrado del CV_{NF} ($1/CV_{NF}^2$) fue utilizada para estimar diferencias en las propiedades de liberación entre dos condiciones donde se esperaban cambios en estas propiedades, puesto que este método proporciona una estimación de la función presináptica (Faber y Korn, 1991; Debanne et al., 1995; Debanne et al., 1996; Foster y McNaughton, 1991; Voronin et al., 1999). El CV_{NF} de la potencia sináptica (excluyendo fallos) fue utilizado para estimar la varianza de los aciertos, como un indicador de la variabilidad de las respuestas cuánticas.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El programa “Excel” incluido en el conjunto de programas denominado “Microsoft Office 2003” se usó para el tratamiento estadístico de los resultados. Los datos son

expresados como la media \pm el error estándar, indicándose en cada caso el número de datos (n). Las diferencias estadísticas fueron establecidas utilizando el test *t de Student* de muestras emparejadas o no emparejadas según correspondiese a cada muestra. Este test es normalmente utilizado para estimar si las medias de dos poblaciones difieren estadísticamente. El límite de significación estadístico fue establecido con $P < 0.05$, estableciéndose que las diferencias son significativas (*, $P < 0.05$), muy significativas (**, $P < 0.01$), y altamente significativas (***, $P < 0.001$). En algunos casos para el análisis de la distribución de amplitudes de los EPSCs se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov, que es un test no paramétrico que permite comparar dos distribuciones de probabilidad acumulada que no presentan una distribución normal, entendiéndose por distribución de probabilidad acumulada una función de densidad calculada a partir de un histograma de frecuencias.

IV. RESULTADOS

1. MODULACIÓN COLINÉRGICA PRESINÁPTICA DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN HIPOCAMPO.

Las sinapsis funcionales de las CS presentaron EPSCs glutamatérgicos tanto en el V_m de reposo (-60 mV) como cuando la célula fue despolarizada a +60 mV ($n=47/85$ o 53 %: Sinapsis Funcional, Fig. 4A). Por el contrario, las sinapsis silentes solo presentaron EPSCs cuando la célula fue despolarizada a +60 mV ($n=38/85$ o 47 %: Sinapsis Silente, Fig. 4B). La constante de tiempo de subida del EPSC (estimada ajustando una única función exponencial) fue menor en las sinapsis funcionales que en las silentes y alcanzó el máximo con una constante de tiempo $\tau_{media} = 2.7 \pm 0.3$ ms ($n=47$, $\tau_{max.} = 3.0$ ms) en las sinapsis funcionales, mientras en las silentes fue $\tau_{media} = 3.8 \pm 0.2$ ms ($n=38$, $\tau_{min.} = 3.2$ ms; $P<0.01$; ambos a +60 mV; Fig. 4A y B). Estas medidas confirmaron que el componente AMPA (con cinética más rápida) estaba presente en el EPSC evocado en las sinapsis funcionales y estaba ausente en las sinapsis silentes a +60 mV.

Estudios previos han demostrado que la interacción colinérgica con la transmisión glutamatérgica (Aigner, 1995) puede influenciar ciertas formas de plasticidad sináptica que se piensan subyacen a fenómenos de aprendizaje y memoria (Madison et al., 1991; Goda y Stevens, 1996; Hasselmo, 1999), y que lesiones de las proyecciones colinérgicas producen déficit de atención y memoria (e.g., Hasselmo, 1999). Además, está bien establecido que los agonistas colinérgicos inhiben presinápticamente los EPSCs de las CS en las neuronas piramidales de CA1, a través de la activación de receptores muscarínicos (Hounsgaard, 1978; Valentino y Dingleline, 1981; Herreras et al., 1988; Sheridan y Sutor, 1990; Qian y Saggau, 1997; Fernández de Sevilla y Buño, 2003).

Basándonos en resultados previos obtenidos en el laboratorio que mostraba que agonistas colinérgicos como Carbacol (CCh) inhibían en mayor proporción el componente AMPA del EPSC glutamatérgico provocado por estimulación convencional de las CS, estudiamos si este hecho podría ser debido a una modulación diferencial de los dos tipos de sinapsis glutamatérgicas que hay en el hipocampo.

Se observó que la perfusión con CCh (5 μ M) redujo significativamente la amplitud del EPSC promedio en las sinapsis funcionales (medido a +60 mV) un 67.8 ± 7.5 %, pasando de 12.3 ± 1.0 pA en control a 3.9 ± 1.1 pA en presencia de CCh ($n=14$, $P<0.001$; Fig. 5A). Por el contrario, en las sinapsis silentes la amplitud del EPSC promedio no se redujo significativamente, ya que solo disminuyó un 24.9 ± 9.1 % (de 11.2 ± 1.7 pA a 8.4 ± 1.3 pA; $n=12$, $P>0.05$; Fig. 5B). La perfusión con CCh incrementó significativamente el

porcentaje de fallos en las sinapsis funcionales ($36.3 \pm 4.5 \%$; $n=14$, $P<0.001$) pero no en las sinapsis silentes ($6.7 \pm 3.2 \%$; $n=12$, $P>0.05$) (Figs. 5C, D y E).

También se estudió el efecto de la perfusión con CCh sobre la potencia sináptica y observamos que en las sinapsis silentes la potencia sináptica no se vio modificada significativamente (21.6 ± 3.1 pA en control frente a 19.8 ± 3.1 pA en CCh a $+60$ mV, $n=12$, $P>0.05$; Fig. 5D). No todas las sinapsis funcionales se comportaron de la misma manera en presencia de CCh, ya que en un grupo la potencia sináptica no se vio modificada (23.9 ± 1.8 pA en control frente a 18.8 ± 1.4 pA en CCh a $+60$ mV; $n = 7$, $P>0.05$; Fig. 5C), mientras que en otro grupo la potencia sináptica se redujo de manera significativa un $21.7 \pm 2.7 \%$ ($P<0.01$; $n=7$; Figs. 6B y C) por la perfusión con CCh, lo que nos indica que también existe cierta heterogeneidad entre las sinapsis funcionales (ver apartado 3 de resultados y Discusión).

Con el propósito de comprobar si la inhibición con CCh era mediada por mecanismos presinápticos, se analizó si la facilitación por pares de pulsos (PPF), que es un mecanismo de plasticidad a corto plazo presináptico, era afectada por la perfusión con CCh. Observamos que tras la aplicación de CCh el índice de PPF ($(R2-R1)/R1$; donde $R1$ y $R2$ son el 1º y 2º EPSC, respectivamente) incrementó significativamente en las sinapsis funcionales (pasando de 0.36 ± 0.15 a 0.70 ± 0.18 ; $n = 7$; $P<0.05$; Fig. 6C), mientras que en las sinapsis silentes no se modificó (de 0.05 ± 0.05 a 0.31 ± 0.11 ; $n = 12$; $P>0.05$; Fig. 6G).

Estas diferencias implican que la regulación de la liberación de glutamato se puede modular de manera diferencial en ambos tipos de sinapsis. Este hecho junto con las evidencias obtenidas por otros grupos (revisado en Voronin y Cherubini, 2004) sugieren la existencia de diferencias funcionales presinápticas entre ambos tipos de sinapsis. Por ello nos planteamos el estudio de las propiedades de liberación de neurotransmisor en ambos tipos de sinapsis.

2. LAS PROPIEDADES DE LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR SON DIFERENTES EN LAS SINAPSIS SILENTES Y LAS SINAPSIS FUNCIONALES.

Para estudiar las propiedades de liberación el primer acercamiento es la comparación del porcentaje de fallos (parámetro puramente presináptico, que sirve como indicador de la probabilidad de liberación) en las sinapsis funcionales y las silentes a $+60$ mV, y se

observó que el porcentaje de fallos fue significativamente mayor en las sinapsis silentes ($73.5 \pm 1.8 \%$; $n=26$) que en las sinapsis funcionales ($58.3 \pm 2.7 \%$; $P<0.001$; $n=36$, Fig. 7C).

También se comparó la “potencia sináptica” de ambos tipos de sinapsis a +60 mV. Las sinapsis funcionales muestran EPSCs compuestos formados por un componente AMPA inicial y rápido y un componente NMDA tardío, mientras que las sinapsis silentes solo presentan el componente NMDA. Por tanto para poder comparar la amplitud del componente NMDA en ambos tipos de sinapsis, estimamos la amplitud del componente NMDA (como se ha descrito en la sección de Material y Métodos) midiendo a 30 ms del artefacto de estimulación, donde a +60 mV la contribución del componente AMPA ha terminado y solo contribuye el componente NMDA. De esta manera encontramos que la potencia sináptica del componente NMDA fue mayor en las sinapsis funcionales (20.4 ± 1.5 pA; $n=36$) que en las sinapsis silentes (15.2 ± 1.3 pA; $P<0.05$; $n=26$, Fig. 7D). Como se ha mencionado anteriormente se comprobó que el componente AMPA en las sinapsis funcionales había terminado antes de 30 ms, para ello en siete sinapsis funcionales registramos el EPSC compuesto evocado por 100 estímulos consecutivos a +60 mV tanto en ACSF modificado (EPSC compuesto por AMPA + NMDA) así como después de aislar el componente AMPA bloqueando el componente NMDA mediante la aplicación de APV (50 μ M). El EPSC compuesto presenta su pico de amplitud a 12.5 ± 0.6 ms con una amplitud media de 26.0 ± 2.7 pA ($n=7$). Estos valores no son estadísticamente diferentes del resto de sinapsis funcionales analizadas en el estudio (28.4 ± 1.5 pA; 11.9 ± 1.3 ms; $P>0.05$; $n=36$). Por tanto, estas siete sinapsis son representativas de la muestra de 36 sinapsis analizadas.

También se analizó el CV_{NF} del promedio del EPSC (100 estímulos, incluyendo fallos), y el CV_{NF} de la potencia sináptica de las respuestas NMDA, utilizando el mismo procedimiento descrito para la estimación de la amplitud, para ambos tipos de sinapsis, siendo 1.02 ± 0.1 y 0.52 ± 0.03 para las sinapsis funcionales, y 2.3 ± 0.7 y 0.29 ± 0.03 para las sinapsis silentes, respectivamente ($P<0.001$ en ambos casos; $n=36$ y $n=26$, respectivamente). El CV_{NF} del EPSC promedio fue significativamente mayor en las sinapsis silentes que en las funcionales, consistente con el mayor porcentaje de fallos. Por el contrario, el CV_{NF} de los aciertos fue mayor en las sinapsis funcionales que en las silentes, sugiriendo una menor variabilidad de amplitud en las respuestas cuánticas de las sinapsis silentes.

Por consiguiente, tanto la probabilidad de liberación como la potencia sináptica fueron mayores en las sinapsis funcionales que en las silentes, apoyando la hipótesis de que existen diferencias en las propiedades de liberación de neurotransmisor entre estos dos tipos de sinapsis. Estos hechos modifican el concepto clásico de que las sinapsis silentes son exclusivamente de origen presináptico o postsináptico.

3. LA PLASTICIDAD SINÁPTICA A CORTO PLAZO REVELA DIFERENCIAS EN LA REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR ENTRE LAS SINAPSIS FUNCIONALES Y SILENTES.

Para verificar estas posibles diferencias presinápticas, se estudió la PPF, que como ya se ha mencionado anteriormente, es una forma de plasticidad a corto plazo atribuida a mecanismos presinápticos. Con estimulación convencional, la PPF se caracteriza porque el segundo EPSC (R2) es mayor que el primero (R1), cuando es evocado en un corto intervalo de tiempo con respecto a éste (Creager et al., 1980; de Sevilla et al., 2002). Cuando se utiliza estimulación “mínima”, la PPF no se observa en respuesta a la aplicación de un único par de pulsos debido a la naturaleza probabilística de la liberación, pero puede ser observada cuando se promedian varias respuestas sucesivas, debido principalmente al menor porcentaje de fallos en R2 con respecto a R1 (Creager et al., 1980; Dobrunz y Stevens, 1997; Hanse y Gustafsson, 2001a, b, c; de Sevilla et al., 2002; Zucker y Regehr, 2002).

3.1. La PPF en las sinapsis funcionales es causada por una mayor probabilidad de liberación y una mayor potencia sináptica de R2 con respecto a R1.

En las sinapsis funcionales, se observó que el EPSC promedio, incluyendo fallos, evocado por estimulación con pares de pulsos (separados un intervalo de 50 ms), presentó mayor amplitud para R2 que para R1, tanto a +60 mV ($R2 = 15.9 \pm 1.4$ pA y $R1 = 11.1 \pm 1.0$ pA; $P < 0.001$; $n=36$) como a -60 mV ($R2 = -11.1 \pm 0.9$ pA y $R1 = -6.8 \pm 0.5$ pA; $P < 0.001$; $n=36$; Fig. 8A y B). Estos resultados implican que la eficacia sináptica de R2 fue mayor que la de R1 (Fig. 8B). A partir de estos valores se calculó un índice de PPF ($(R2-R1)/R1$) (de Sevilla et al., 2002; Martín y Buño, 2003), siendo 0.5 ± 0.1 a +60 mV y 0.7 ± 0.1 a -60 mV ($P > 0.05$; $n=36$; Fig. 8C), por lo tanto no hubo diferencias significativas entre los resultados encontrados a ambos potenciales de membrana.

Durante la estimulación con pares de pulsos, el porcentaje de fallos en R1 fue mayor que el de R2. A +60 mV, el porcentaje de fallos de R1 fue $58.3 \pm 2.7 \%$ y $48.1 \pm 2.8 \%$ para R2 ($P < 0.001$; $n=36$), mientras que a -60 mV, el porcentaje de fallos de R1 fue $61.5 \pm 2.1 \%$ y R2 $45.2 \pm 3.2 \%$ ($P < 0.001$; $n=36$). Además, el porcentaje de fallos de R1 y R2 fue prácticamente idéntico a -60 mV y +60 mV ($P > 0.05$; $n=36$; Fig. 8E), apoyando la hipótesis de que las diferencias en el porcentaje de fallos entre ambos EPSCs resulta de una influencia presináptica, y minimiza la posibilidad de que estuviésemos estimulando más de un tipo de sinapsis. Al mismo tiempo se calculó el $1/CV^2$ de la respuesta promedio (incluyendo 100 trazos sucesivos) y encontramos que fue mayor para R2 que para R1 (10.3 ± 1.6 y 1.5 ± 0.1 , respectivamente, $P < 0.001$; $n=36$), resultado consistente con un efecto mediado por mecanismos presinápticos.

En promedio encontramos que en las sinapsis funcionales incluidas en el estudio, la potencia sináptica de R2 fue mayor que la de R1 tanto a +60 mV como a -60 mV (Figs. 8D y F). A +60 mV la potencia sináptica fue 28.4 ± 1.5 pA para R1 y 32.7 ± 1.9 pA para R2 ($P < 0.001$; $n=36$) y a -60 mV, fue -16.0 ± 0.9 pA para R1 y -19.5 ± 1.2 pA para R2 ($P < 0.001$; $n=36$). Se calculó además un índice de potencia sináptica $((P2-P1)/P1)$ donde P1 y P2 son las potencias sinápticas de R1 y R2 respectivamente. Un índice de potencia de cero indicaría que en el promedio la amplitud del pico de R2 debería ser idéntica a la de R1, resultado consistente con que se libera la misma cantidad de neurotransmisor por ambos potenciales de acción. Sin embargo, el índice de potencia sináptica fue > 0 para la mayor parte de las sinapsis funcionales analizadas ($P < 0.001$; $n=26$), resultado posiblemente debido a un incremento de la probabilidad de liberación de R2 con respecto a R1 combinado con un mayor número de contactos sinápticos activados por aferente (Hsia et al., 1998; revisado en Dumas, 2005), que podría ser causado por la activación de un único terminal con numerosos sitios de liberación, o por el reclutamiento de varios terminales de una misma fibra presináptica. En este escenario, el número de *quantum* liberado por un único potencial de acción estaría determinado conjuntamente por el número de sitios de liberación que presentan los terminales de las CS con una neurona postsináptica de la región de CA1, y la probabilidad de liberación de cada sitio de liberación, la cuál varía durante la estimulación con pares de pulsos. Debe mencionarse que también se encontró un grupo de sinapsis funcionales ($n=10$) en el cual el índice de potencia sináptica no fue significativamente diferente de cero (cf., de Sevilla et al., 2002).

A pesar de esto, en todas la sinapsis funcionales el índice de potencia sináptica fue prácticamente idéntico a -60 mV y a +60 mV ($P>0.05$; $n=36$).

También se calculó el $1/CV^2$ solo para los aciertos y se vio que es mayor para R2 que para R1 (8.5 ± 1.3 y 5.4 ± 0.7 , respectivamente; $P<0.05$; mismas sinapsis), apoyando la hipótesis de que las diferencias en la potencia sináptica se deben principalmente a mecanismos presinápticos. En todos estos estudios, la independencia de voltaje de los comportamientos descritos anteriormente minimiza la posible contribución del reclutamiento de sinapsis silentes o de “spillover” (Choi et al., 2000; Maggi et al., 2003).

Para comprobar que la mayor amplitud del segundo EPSC (R2) no era debida a un efecto postsináptico, se midió la potencia sináptica de R2 tanto cuando R1 había fallado previamente como cuando R1 era un acierto. Cuando R1 falla, el potencial de acción que invade el terminal es incapaz de generar liberación de neurotransmisor, y no hay posibilidad de que exista un efecto postsináptico del primer estímulo que pudiera modificar R2. Se observó que la potencia sináptica de R2 era similar cuando se calculó para aquellas respuestas que presentaban un acierto previo en R1, como cuando no había habido un acierto en R1 ($P>0.05$; $n=36$) (Figs. 9A-B₂). Las distribuciones de probabilidad acumulada del pico de amplitud de R2 fueron también prácticamente idénticas en ausencia o presencia de R1 ($P>0.05$, $n=36$; Figs. 9B₁ y B₂).

Por tanto, estos resultados implican que el incremento de la potencia sináptica de R2 durante la PPF depende principalmente de mecanismos presinápticos y minimizan una posible contribución postsináptica.

La constante de tiempo de subida de los EPSCs y el tiempo al pico fueron similares ($P>0.05$; $n=36$) a ambos potenciales de membrana (-60 mV y +60 mV) en todas las sinapsis funcionales. También, la forma de onda del promedio de R1 y R2 es similar (Fig. 9C), resultados que reducen la posible estimulación de varias fibras presinápticas que resultaría en una constante de subida del EPSC más lenta y una mayor duración de R2 debido a la liberación asincrónica causada por la estimulación simultánea de fibras adicionales con distintas velocidades de conducción (Auger et al., 1998). El mismo resultado fue obtenido para los EPSCs evocados con un pulso único, donde la constante de tiempo de activación no correlaciona con la amplitud del EPSC ($P>0.05$).

3.2. Las sinapsis silentes no presentan PPF.

El mismo tipo de análisis fue realizado en las sinapsis silentes, y en estas se encontró que la amplitud del EPSC promedio era similar en R1 y R2 ($R2 = 7.1 \pm 0.8$ pA y $R1 = 7.0$

± 0.8 pA; $P>0.05$; $n=26$; Fig. 10A), indicando que no hay PPF (el índice de PPF promedio fue 0.01 ± 0.04 ; Figs. 10B y C). Además, encontramos que esto era debido tanto a que R1 y R2 no presentaron diferencias en cuanto al porcentaje de fallos (73.5 ± 1.8 % para R1 y 72.5 ± 2.2 % para R2; $P>0.05$; $n=26$; Fig. 10E), como a que la potencia sináptica de R1 y R2 no eran distintas, siendo para R1 22.6 ± 1.2 pA y 24.2 ± 1.3 pA para R2 ($P>0.05$; $n=26$; Figs. 10D y F).

Además, al igual que en las sinapsis funcionales también se calculó el $1/CV^2$ obtenido incluyendo fallos y fue esencialmente idéntico para R2 y R1 (0.63 ± 0.1 y 0.74 ± 0.08 , respectivamente), y lo mismo ocurrió cuando se calculó el $1/CV^2$ teniendo en cuenta solo los aciertos, siendo 26.1 ± 7.0 para R1 y 40.8 ± 15.3 para R2, respectivamente ($P>0.05$; mismas células).

Por tanto, consistente con el similar porcentaje de fallos, amplitud y $1/CV^2$ de R1 y R2, no se encontró que las sinapsis silentes presentasen PPF. Además, tanto el índice de PPF como el índice de potencia sináptica fueron prácticamente cero para todas las sinapsis silentes analizadas ($P>0.05$; $n=26$). Dado lo llamativo de este resultado debido a la relación existente entre la probabilidad de liberación y la PPF (menor probabilidad de liberación, mayor PPF, Dobrunz y Stevens, 1997), que haría esperar una mayor PPF para las sinapsis silentes que para las funcionales debido a su menor probabilidad de liberación, se comprobó si la ausencia de PPF era un fenómeno independiente del intervalo entre pulsos. Para ello se analizó el efecto de la estimulación con pares de pulsos a diferentes intervalos de tiempo entre 20 y 200 ms, y no se encontró que hubiese PPF en ninguno de los casos en las sinapsis silentes analizadas ($n=4$; datos no mostrados).

Los resultados descritos sugieren que la PPF en las sinapsis funcionales proviene del efecto combinado de un menor porcentaje de fallos y una mayor potencia sináptica de R2 comparada con R1 (Debanne et al., 1996). Se ha postulado que la disminución en el porcentaje de fallos de R2 con respecto a R1 es debida a la señal de Ca^{2+} que permanece en el terminal tras el primer potencial de acción y que se acumula con la entrada de Ca^{2+} que se produce durante el segundo potencial de acción (Katz y Miledi, 1968; Kamiya y Zucker, 1994; Dobrunz y Stevens, 1997; Zucker y Regehr, 2002). La mayor probabilidad de liberación de R2 comparada con R1, combinada con la existencia de más de un contacto por aferente podría explicar la mayor liberación de R2 con respecto a R1 (Debanne et al., 1996). Por el contrario, el porcentaje de fallos y la potencia sináptica de R1 y R2 son

similares en las sinapsis silentes, sugiriendo que el control presináptico dependiente de actividad durante la PPF no está presente en las sinapsis silentes.

Debe señalarse que en un grupo de sinapsis funcionales que mostraban PPF, esta no se acompañaba por un incremento en la potencia sináptica de R2. En estas sinapsis funcionales la PPF es exclusivamente causada por una disminución en la proporción de fallos de R2 comparado con R1 ($n=10$). La potencia sináptica también permanece insensible a otras modificaciones que modifican la probabilidad de liberación en estas sinapsis funcionales, como es la perfusión con CCh, como se ha mostrado en el apartado 1 de resultados (de Sevilla et al., 2002). Por tanto, es posible que estas sinapsis funcionales presenten solamente un único contacto sináptico por aferente. Consecuentemente, las sinapsis funcionales no son una muestra homogénea en cuanto a sus propiedades de liberación de neurotransmisor. A pesar de que las diferencias en las propiedades de liberación de los distintos tipos de sinapsis funcionales podrían ser de relevancia fisiológica, su investigación requiere un extenso análisis que debería ser tratado independientemente y que escapa al objetivo de esta tesis que se centra en las diferencias globales en las propiedades de liberación de las sinapsis silentes y funcionales.

Estas diferencias en las propiedades de liberación entre ambos tipos de sinapsis sugieren que la cantidad de neurotransmisor liberado por un potencial de acción que invade el terminal, es un proceso más finamente regulado en las sinapsis funcionales que en las sinapsis silentes. Por tanto, la principal conclusión de los resultados descritos hasta ahora es que los terminales presinápticos de ambos tipos de sinapsis son funcionalmente diferentes.

4. LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR ES REGULADA POR LOS RESERVORIOS INTRACELULARES DE Ca^{2+} PRESINÁPTICOS EN LAS SINAPSIS FUNCIONALES PERO NO EN LAS SILENTES.

La contribución de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE) y la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (LCIC) en la liberación de neurotransmisor en las sinapsis del SNC es actualmente materia de debate (ver Discusión). En las sinapsis del hipocampo la LCIC puede contribuir a la PPF amplificando la señal de Ca^{2+} inducida por la llegada del segundo potencial de acción (Emptage et al., 2001). Dadas las diferencias en la PPF que presentan las sinapsis silentes y las sinapsis funcionales, es posible que estas sean debidas en parte a diferencias en las propiedades de la LCIC en los terminales correspondientes o en el control de la concentración de Ca^{2+} intraterminal

(Galante y Marty, 2003). Por este motivo, se analizaron los efectos de las modificaciones de la LCIC y la regulación de los reservorios de Ca^{2+} del RE.

La perfusión con ryanodina (100 μM), bloqueante de los receptores de ryanodina (RyRs), incrementó el porcentaje de fallos y redujo la potencia sináptica y la PPF en las sinapsis funcionales de un modo gradual (Figs. 11A-D). El efecto de ryanodina alcanzó su máximo después de $\approx 25\text{-}30$ min y fue idéntico a -60 y $+60$ mV ($P > 0.05$; en adelante solo se muestran los datos a $+60$ mV para simplificar la descripción). El porcentaje de fallos incrementó un 32% para R1 (de 55.4 ± 6.9 a 73.2 ± 4.7 ; $P < 0.05$; $n=6$) y un 56% para R2 (de 45.2 ± 8.5 a 70.6 ± 5.4 ; $P < 0.05$; $n=6$), mientras que la potencia sináptica disminuyó un 21% para R1 (de 35.8 ± 2.2 a 28.1 ± 1.1 ; $P < 0.01$; $n=6$) y un 24% para R2 (de 41.4 ± 2.4 a 31.2 ± 0.6 ; $P < 0.01$; $n=6$).

Ryanodina también redujo el índice de PPF de 0.44 ± 0.1 a 0.16 ± 0.05 ($P < 0.05$). En este caso, una reducción de la probabilidad de liberación causó un decremento de la PPF, contradiciendo la relación inversa entre la probabilidad de liberación y la PPF usualmente aceptada (Dobrunz y Stevens, 1997; Dobrunz, 2002; pero ver Hanse y Gustafsson, 2001). Sin embargo, un efecto similar de la ryanodina sobre la PPF ha sido interpretado como indicativo de que la LCIC amplifica la señal de Ca^{2+} generada por la llegada del primer potencial de acción al terminal presináptico, y esta se suma con la entrada de Ca^{2+} activada por el segundo potencial de acción (Emptage et al., 2001). Los efectos de ryanodina fueron idénticos a -60 y $+60$ mV, sugiriendo que estaba actuando a nivel presináptico y minimizando la posibilidad de modificaciones a nivel postsináptico. Una concentración más baja de ryanodina (50 μM) mostró una tendencia a efectos similares, pero los cambios no fueron estadísticamente significativos (datos no mostrados; $n=6$). Los efectos de la ryanodina en las sinapsis funcionales se recuperaron $\approx 20\%$ después de un periodo de lavado de ≈ 50 min ($n=6$).

Para verificar que la regulación de los reservorios de Ca^{2+} del RE o que la LCIC están implicados en la liberación de neurotransmisor en las sinapsis funcionales, estudiamos también el efecto de la perfusión con thapsigargina, que vacía los reservorios de Ca^{2+} inhibiendo la recaptación por la Ca^{2+} -ATPasa. Inicialmente, la perfusión con thapsigargina (1 μM , ≈ 15 min de perfusión) disminuyó el porcentaje de fallos e incrementó la potencia sináptica y la PPF, consistente con el incremento inicial de la concentración de Ca^{2+} intracelular debida al vaciado de los reservorios del RE (Clementi et al., 1992).

Sin embargo, después de este periodo inicial thapsigargina gradualmente incrementó el porcentaje de fallos y redujo la potencia sináptica y la PPF. Para R1 el porcentaje de fallos incrementó un 29% (de 68.1 ± 1.4 a 87.9 ± 1.7 ; $P < 0.05$; $n=3$) y la potencia sináptica disminuyó un 35% (de 24.6 ± 1.8 a 16.01 ± 1.2 ; $P < 0.05$; $n=3$), mientras que para R2, el porcentaje de fallos incrementó un 28% (de 60.3 ± 2.1 a 84.8 ± 2.6 ; $P < 0.05$; $n=3$), y la potencia sináptica disminuyó un 47% (de 33.1 ± 1.8 a 17.5 ± 1.6 ; $P < 0.05$; $n=3$). Además el índice de PPF se redujo un 134% (de 1.24 ± 0.5 a -0.42 ± 0.6 ; $P < 0.05$; $n=3$). Estos efectos de thapsigargina alcanzaron su máximo después de ≈ 30 -40 min y fueron idénticos a -60 y +60 mV, sugiriendo un efecto a nivel presináptico. No hubo recuperación de los efectos de thapsigargina tras un lavado > 60 min.

La aplicación de cafeína (10 mM), que incrementa la sensibilidad a Ca^{2+} de los receptores de ryanodina, amplificando por tanto la LCIC, disminuyó el porcentaje de fallos, incrementó la potencia sináptica y redujo la PPF en las sinapsis funcionales (Figs. 11A-D). El porcentaje de fallos y la potencia sináptica de R1 cambió mas que los de R2; en R1 el porcentaje de fallos disminuyó un 84%, (de 65.8 ± 8.2 a 9.6 ± 4.9 ; $P < 0.001$; $n=8$), y en R2 un 45% (de 52.4 ± 8.6 a 20.6 ± 8.1 ; $P < 0.05$; $n=8$). La potencia sináptica de R1 incrementó un 74% (de 29.6 ± 3.0 a 49.2 ± 6.0 ; $P < 0.05$; $n=8$), y la potencia de R2 incrementó un 32%, (de 33.6 ± 4.5 a 44.7 ± 6.2 ; $P < 0.05$; $n=8$). El índice de PPF se redujo de 0.45 ± 0.2 a -0.19 ± 0.1 ($P < 0.01$). Los efectos de cafeína fueron insensibles a un lavado prolongado (> 60 min), efecto que puede ser atribuido a la persistente potenciación de la liberación de glutamato inducida por cafeína en las sinapsis de las CS (Martín y Buño, 2003).

Por el contrario, ryanodina no modificó significativamente el porcentaje de fallos ni de R1 ni R2 en las sinapsis silentes (de 76.4 ± 1.8 a 80.0 ± 2.1 ; $P > 0.05$; $n=8$ para R1, y de 75.6 ± 3.0 a 81.3 ± 2.5 ; $P > 0.05$; $n=8$ para R2; Fig. 12C). La potencia sináptica tampoco se vio afectada por ryanodina en estas sinapsis (de 21.1 ± 1.7 a 18.5 ± 1.4 , para R1; y de 23.1 ± 2.1 a 18.7 ± 1.5 , para R2; $P > 0.05$; $n=8$ en ambos casos, Fig. 12B). Además las sinapsis silentes fueron también insensibles a la aplicación de cafeína, y no cambió ni el porcentaje de fallos de R1 ni de R2 (de 70.3 ± 4.9 a 64.0 ± 8.7 , para R1; y de 69.6 ± 3.4 a 68.3 ± 7.4 , para R2; $P > 0.05$; $n=7$; Fig. 12C), y tampoco se modificó la potencia sináptica de estas sinapsis (de 24.8 ± 3.1 a 27.2 ± 3.2 , para R1; y de 27.6 ± 3.4 a 26.8 ± 2.9 , para R2; $P > 0.05$; $n=7$ en ambos casos; Fig. 12B). Además, ni la ryanodina ni la cafeína modificaron el índice de PPF en las sinapsis silentes ($P > 0.05$; $n=8$ y 7 respectivamente; Fig. 12D).

Estos resultados indican que la LCIC y la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, como el RE, contribuyen de manera importante en la regulación de la liberación de glutamato y en la plasticidad a corto plazo en las sinapsis funcionales, y sin embargo no afectan la liberación en las sinapsis silentes, así como tampoco modifican la ausencia de PPF. Todo esto confirma la existencia de diferencias en la regulación de la liberación de neurotransmisor entre ambos tipos de sinapsis glutamatérgicas, apoyando la hipótesis de que las sinapsis silentes no son solo de origen pre o postsináptico sino que al mismo tiempo que no presentan receptores de tipo AMPA postsinápticos, presentan una liberación de neurotransmisor con menor probabilidad de liberación, y que no está sujeta al mismo tipo de regulación que la liberación de neurotransmisor en las sinapsis funcionales.

5. LA CONVERSIÓN DE SINAPSIS SILENTES EN SINAPSIS FUNCIONALES MODIFICA LAS PROPIEDADES DE LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR.

Otros grupos han demostrado que las sinapsis silentes pueden ser convertidas en sinapsis funcionales mediante diferentes manipulaciones, proponiendo que este fenómeno pudiese ser la base de algunos tipos de LTP en el hipocampo (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995).

Hasta ahora los distintos estudios se habían centrado principalmente en el hecho de que durante la LTP se insertan nuevos receptores AMPA en la densidad postsináptica de las sinapsis silentes, sin embargo, una vez demostrado el hecho de que ambos tipos de sinapsis son presinápticamente diferentes (Cabezas y Buño, 2006), es de suponer que estas características deben cambiar de manera paralela a la inserción de receptores durante la LTP (Fig. 13). Por ello nos planteamos el estudio de la conversión de sinapsis silentes en funcionales analizando los cambios en la liberación de neurotransmisor y su regulación, además de la ya demostrada inserción postsináptica de receptores AMPA.

Para el estudio de la conversión de sinapsis silentes en funcionales empleamos un paradigma de potenciación consistente en aparear la estimulación “mínima” con pulsos pareados (50 ms, intervalo entre pulsos), de una fibra presináptica con la despolarización de la célula postsináptica. Una vez identificado un contacto sináptico como silente se fijó el potencial de la neurona postsináptica a +30 mV y se estimuló con pulsos pareados (50 ms, intervalo entre pulsos) a una frecuencia de 1 Hz, durante 10-15 min. (Fig. 14B), protocolo que permite la coincidencia de la despolarización postsináptica, que libera a los receptores de NMDA del bloqueo extracelular por Mg^{2+} , con la estimulación de las fibras presinápticas, favoreciendo el influjo de Ca^{2+} por estos receptores.

En todas las sinapsis silentes estudiadas se observó que el protocolo de apareamiento utilizado induce la aparición de respuestas sinápticas mediadas por receptores AMPA que previamente estaban ausentes (Figs. 14A y B), como ya se había demostrado en otros estudios (Liao et al., 1995; Isaac et al., 1995). Estas respuestas se observan tanto en el potencial de reposo (-60 mV), como a potenciales despolarizados, ya que como se ve en la figura 14A las corrientes se hacen más rápidas, hecho que se confirmó cuando se midió la constante de tiempo de subida del EPSC que disminuyó significativamente, tanto para R1 (pasando de 4.6 ± 0.8 ms a 2.6 ± 0.3 ms), como para R2 (de 4.5 ± 0.6 ms a 2.5 ± 0.2 ms; $P < 0.05$; en ambos casos $n=10$; Fig. 15A).

También se analizaron las características presinápticas que diferencian ambos tipos de sinapsis. Una de las principales diferencias descritas entre ambos tipos de sinapsis es la ausencia de PPF en las sinapsis silentes y su presencia en las funcionales acompañado de una mayor eficacia sináptica. La adquisición de este fenómeno de plasticidad a corto plazo en un intervalo corto de tiempo (10-15 minutos) podría ser de gran relevancia en el procesamiento de las señales sinápticas. Por este motivo, lo primero que se analizó fue el cambio que se produce en la eficacia sináptica (+60 mV; Fig. 14A), y se observó que el pico del EPSC promedio se vio incrementado significativamente tanto para R1 como para R2 (R1 incrementó un 114%, de 4.8 ± 0.5 pA a 10.5 ± 2.6 pA; $P < 0.05$; y R2 incrementó un 267%, de 3.8 ± 0.5 pA a 13.4 ± 3.1 pA; $P < 0.01$; $n=10$ en ambos casos; Fig. 15B). A partir de los valores del EPSC promedio se calcula el índice de PPF y se observó un drástico aumento de la PPF tras el protocolo de potenciación, incrementando de -0.08 ± 0.1 a 0.34 ± 0.08 ($P < 0.01$; $n=10$; Fig. 15C).

Este aumento de la eficacia sináptica podría ser debido tanto a un aumento de la potencia sináptica como a un aumento de la probabilidad de liberación o a la combinación de ambos fenómenos. Analizando el porcentaje de fallos, como indicador de la probabilidad de liberación, parámetro puramente presináptico, se observó que el porcentaje de fallos disminuyó de manera significativa para ambos EPSCs (R1 de 79.2 ± 1.8 % a 59.6 ± 4.1 %; $P < 0.01$; y R2 de 80.2 ± 1.5 % a 54.7 ± 4.0 %; $P < 0.01$; $n=10$ en ambos casos; Fig. 16A). Es quizá más relevante que las sinapsis funcionales recientemente creadas también presentaron mayor probabilidad de liberación en R2 que en R1, lo que constituye una característica de las sinapsis funcionales ($P < 0.05$; Fig. 16A). También se midió el porcentaje de fallos de las respuestas mediadas por receptores AMPA (-60 mV), en este caso se pasó de no tener ningún acierto (100 % fallos) en control, cuando la sinapsis es silente, a observarse tras la potenciación que el porcentaje de fallos en R1 era mayor que

en R2 ($R1 = 65.8 \pm 8.6 \%$ y $R2 = 51.6 \pm 8.6 \%$; $P < 0.001$; $n = 10$; Fig. 16A), al igual que a $+60$ mV, otra característica diferencial de las sinapsis funcionales.

Para comprobar que tras la potenciación se sigue estimulando una sola fibra, y que la aparición de respuestas AMPA no se debió al reclutamiento de nuevas fibras, se comparó el porcentaje de fallos de ambos EPSCs a los dos potenciales de membrana comprobándose que no había diferencias significativas, ni para R1 ni para R2 ($P > 0.05$), indicando que se estaba estimulando una sola fibra, por tanto los EPSCs observados en el V_m de reposo y el incremento de probabilidad de liberación observado a V_m despolarizado eran posiblemente debidos a la potenciación presináptica de la sinapsis registrada en cada caso.

Como se ha demostrado anteriormente la potencia sináptica de las sinapsis silentes y funcionales es diferente, por ello también se analizó si la potencia sináptica cambiaba tras el proceso de conversión. Analizando la amplitud del pico del EPSC observamos que se produjo un incremento significativo tanto en R1 (de 21.0 ± 1.7 pA a 26.5 ± 2.8 pA; $P < 0.05$) como en R2 (de 22.5 ± 2.2 pA a 30.6 ± 3.2 pA; $P < 0.05$) (Fig. 16B), pero este aumento podía ser debido en parte a que a $+60$ mV también estaba contribuyendo la respuesta mediada por los receptores AMPA, por ello se analizó la potencia sináptica de la respuesta mediada únicamente por el componente NMDA, comparando la potencia sináptica obtenida midiendo la amplitud del EPSC a 30 ms del artefacto de estimulación, donde el componente AMPA no contribuye a la respuesta (ver Materiales y Métodos). En este caso se observó igualmente que tanto R1 como R2 aumentaron de manera significativa (R1 pasa de 9.3 ± 0.8 pA a 16.0 ± 2.6 pA; $P < 0.05$; y R2 incrementa de 12.5 ± 1.8 pA a 19.4 ± 3.1 ; $P < 0.01$; $n = 10$; Fig. 16B).

Anteriormente se ha descrito que la mayoría de las sinapsis funcionales se caracterizaban por presentar un índice de potencia sináptica > 0 , debido a que la potencia sináptica de R2 era mayor que la de R1. En estas sinapsis funcionales de nueva creación observamos también este fenómeno, tanto en el EPSC compuesto, como en el mediado por receptores NMDA. En ambos casos en promedio R2 fue mayor que en R1 ($P < 0.01$ y $P < 0.05$, respectivamente, $n = 10$), y por consiguiente el índice de potencia sináptica fue significativamente diferente de cero ($P < 0.05$ en ambos casos) en la mayoría de las sinapsis, sin embargo en tres de las sinapsis estudiadas el índice de potencia sináptica fue prácticamente cero, debido a que no había diferencias en la potencia sináptica de R1 y R2, como ocurría en un grupo de sinapsis funcionales, en el cual la PPF era debida exclusivamente a la mayor probabilidad de liberación de R2. Estas sinapsis podrían

corresponder a un proceso de conversión incompleto, ya que a pesar de incorporar receptores AMPA postsinápticos, y que la probabilidad de liberación aumentó, no presentaron un incremento significativo de la PPF, lo cual puede indicar que el proceso de conversión no ocurre en todos los terminales de la misma forma. Otra posible explicación es que estas sinapsis se conviertan en sinapsis funcionales pertenecientes al grupo que se mencionó anteriormente que no presentaron diferencias en la potencia sináptica entre R1 y R2.

En resumen, estos resultados confirman la hipótesis de que durante procesos de potenciación asociados a la inserción de receptores AMPA postsinápticos en las sinapsis previamente silentes, se producen cambios en las propiedades de liberación de neurotransmisor en los terminales presinápticos de las CS potenciadas.

5.1. Modulación colinérgica de las sinapsis funcionales generadas por la conversión de sinapsis silentes.

Como se ha descrito anteriormente una de las principales diferencias entre ambos tipos de sinapsis era la regulación selectiva de la liberación de neurotransmisor en las sinapsis funcionales mediada por agentes colinérgicos a nivel presináptico (de Sevilla et al., 2002, Cabezas y Buño, 2006). Debido a que este hecho puede usarse como herramienta para identificar el tipo de sinapsis que está siendo estimulada, en algunos de los experimentos tras el proceso de potenciación se añadió CCh (5 μ M) al ACSF modificado con el propósito de comprobar si estas “nuevas” sinapsis funcionales adquieren en un corto periodo de tiempo (10-15 min) la sensibilidad a CCh previamente ausente.

Considerando que una sinapsis silente se convierte en funcional con la incorporación de receptores AMPA, en 6 de las células potenciadas se aplicó CCh (5 μ M) una vez que se distinguió la aparición de respuestas AMPA a -60 mV (Fig. 17A y B). Estas sinapsis fueron inhibidas por la perfusión con CCh, y esta inhibición, al igual que se describió anteriormente, fue susceptible de revertir mediante lavado (Figs. 17A y B).

La aplicación de CCh disminuyó significativamente la probabilidad de liberación de estas sinapsis aumentando significativamente el porcentaje de fallos tanto en R1 como en R2 (R1: de 71.5 ± 8.7 % a 87.6 ± 4.1 %; $P < 0.05$; y R2 de 56.0 ± 9.9 % a 78.3 ± 7.2 %; $P < 0.01$; $n=6$ en ambos casos; Fig. 18A). CCh también redujo la potencia sináptica de ambos EPSCs (R1 pasa de 27.4 ± 4.4 pA a 18.2 ± 3.2 pA; $P < 0.05$; y R2 disminuyó de 32.2 ± 5.2 pA a 23.4 ± 4.7 ; $P < 0.05$; $n=6$; Fig. 18B). El índice de PPF incrementó un 336%, pasando de 0.55 ± 0.1 a 0.92 ± 0.1 ($P < 0.05$; $n=6$; Fig. 18C).

Estos resultados indican que las sinapsis funcionales recientemente creadas adquieren, en un periodo corto de tiempo, mecanismos reguladores de la liberación de neurotransmisor que previamente no presentaban, de manera que la conversión de sinapsis silentes en funcionales es un proceso complejo y rápido que implica más cambios que la simple inserción de receptores AMPA en la densidad postsináptica, concediéndole al sistema mayor capacidad de regulación y por tanto mayor complejidad.

5.2 La conversión de sinapsis silentes en funcionales subyace a ciertas formas de LTP.

Los resultados anteriores confirman que las sinapsis funcionales generadas por la potenciación de sinapsis previamente silentes adquieren rápidamente la mayoría de las propiedades que caracterizan a las sinapsis funcionales descritas en apartados anteriores, indicando que el fenómeno de conversión de sinapsis silentes, que se postula como uno de los mecanismos responsables de la LTP en hipocampo, se realiza de manera que las “nuevas” sinapsis funcionales presentan ahora una liberación de neurotransmisor más compleja y sujeta a mecanismos de regulación más precisos que no tenían en su estado anterior, confiriéndole más posibilidades de regulación y por tanto mayor plasticidad al sistema.

Con el fin de comprobar si el fenómeno de conversión de sinapsis silentes en funcionales subyace a ciertas formas de LTP como ha sido sugerido por numerosos autores, se analizó el efecto de la estimulación de un grupo de axones de las CS. Para ello lo que se apareó la estimulación “convencional”, que activa un grupo de axones, con la despolarización de las neuronas de CA1, de manera similar a como se hizo con la estimulación “mínima”.

Tras el protocolo de apareamiento (estimulación con pares de pulsos a 1 Hz y mantenimiento de la célula postsináptica a +30 mV) se observó una potenciación de los EPSCs tanto a +60 mV como a -60 mV (Fig. 19A). A -60 mV R1 se potenció un $84.9 \pm 0.03 \%$, pasando de -83.44 ± 0.04 pA a -150.10 ± 0.02 pA ($n=5$, $P<0.05$; Fig. 19B), mientras que R2 se potenció un $53.4 \pm 0.04 \%$, pasando de -115.21 ± 0.03 pA a -177.91 ± 0.01 pA ($n=5$, $P<0.05$; Fig. 19B). Sin embargo a +60 mV, midiendo a 30 ms del artefacto de estimulación para estimar únicamente el componente NMDA del EPSC, R1 no cambió significativamente: $51.07 \pm 0.03 \%$ (de 96.06 ± 0.04 pA a 130.52 ± 0.02 pA; $n=5$, $P=0.05$; Fig. 19B), y tampoco lo hizo R2: $25.40 \pm 0.05 \%$ (de 98.5 ± 0.04 pA a 118.49 ± 0.04 pA; $n=5$, $P>0.05$; Fig. 19B). Estos resultados confirman que con este paradigma de estimulación, sinapsis que previamente eran silentes, y por tanto solo eran detectadas a +60

mV, se convierten en sinapsis funcionales que ahora también contribuyen al EPSC observado a -60 mV.

La PPF sólo se redujo a -60 mV (de 0.44 ± 0.1 a 0.22 ± 0.1 ; $n=5$, $P<0.05$; Fig. 19B), mientras a +60 mV la reducción del índice de PPF, no fue significativa (de 0.07 ± 0.2 a -0.04 ± 0.1 ; $n=5$, $P>0.05$; Fig. 19B). Es importante destacar que, conforme con los resultados obtenidos por otros autores (Poncer y Malinow, 2001), en control el índice de PPF es significativamente mayor a -60 mV que a +60 mV, fenómeno atribuido normalmente al hecho de que a +60 mV están siendo registradas tanto sinapsis silentes como funcionales, mientras a -60 mV, debido al bloqueo por Mg^{2+} , solamente se registran las sinapsis funcionales.

Debido a que el CV_{NF} está determinado principalmente por la liberación estocástica de diferente número de vesículas de los aferentes presinápticos, puede ser utilizado para comparar el comportamiento probabilístico de señales mediadas por distintos receptores. En la situación control se observó que el CV era significativamente mayor a -60 mV que a +60 mV, tanto para R1 (0.49 ± 0.1 y 0.31 ± 0.07 , respectivamente; $n=5$, $P<0.01$) como para R2 (0.38 ± 0.1 y 0.27 ± 0.05 , respectivamente; $n=5$, $P<0.05$), indicando que a potenciales despolarizados el número de sinapsis que estaban siendo activadas era mayor que a potenciales hiperpolarizados, reflejo de que a +60 mV se activan sinapsis silentes que no se observan a -60 mV.

Para estudiar la naturaleza pre o postsináptica de los cambios ocurridos tras la potenciación, se representó la variación de $1/CV^2$ antes y después de la potenciación, frente a la variación de la amplitud media del EPSC (M). Como se observa en la figura 19C, esta relación es diferente para los distintos componentes del EPSC. A -60 mV la mayoría de los puntos del gráfico se agrupan en torno a la diagonal, y en la región superior a esta diagonal, indicativo de que los cambios son principalmente debidos a mecanismos presinápticos (Faber y Korn, 1991). Sin embargo, el componente NMDA cambia menos sin un patrón claro de distribución, lo que no permite discernir la naturaleza de los cambios producidos, pudiendo deberse tanto a cambios presinápticos como postsinápticos.

Estos resultados demuestran que el fenómeno subyacente a la potenciación observada con estimulación “convencional” es la transformación tanto presináptica como postsináptica de sinapsis que previamente eran silentes.

6. MECANISMOS RESPONSABLES DE LA INDUCCIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN DE SILENTES EN FUNCIONALES.

Una vez demostrado que la transformación de sinapsis silentes en funcionales es la base de ciertas formas de plasticidad sináptica en el SNC, y que es un proceso complejo que implica cambios tanto en la densidad postsináptica como en el terminal presináptico, resulta de gran relevancia conocer cuales son los mecanismos responsables de la inducción de este fenómeno, y más aun cómo es la comunicación entre ambas estructuras que regula este fenómeno.

La mayoría de las distintas formas de LTP descritas en la región de CA1 del hipocampo son dependientes de la activación de receptores de tipo NMDA (Bliss y Collingridge, 1993; Nicoll, 2003, Malenka y Bear, 2004), a través de los cuales entra Ca^{2+} , el cual a su vez, mediante la activación de distintas cascadas intracelulares, es responsable de fenómenos de plasticidad sináptica (Cavazzini et al., 2005), por ello lo primero que se planteó fue analizar si la conversión de sinapsis silentes en funcionales era dependiente de la activación de receptores NMDA. Para este estudio lo que se hizo fue, tras identificar, con estimulación “mínima”, una sinapsis como silente, se añadió APV (50 μM) al ACSF modificado y una vez comprobado que la respuesta a +60 mV fue completamente bloqueada (Fig. 20A derecha) se realizó el protocolo de apareamiento de estimulación con pulsos pareados (50 ms, intervalo entre pulsos) a 1 Hz, con la despolarización de la célula postsináptica (+30 mV). Se observó que en estas condiciones no se produjo la inserción de receptores AMPA ya que no aparecieron respuestas sinápticas a -60 mV. Luego se procedió al lavado de APV, y se midió la amplitud del EPSC a +60 mV, observando que no hubo cambios en la amplitud del EPSC promedio ni para R1 ($92.1 \pm 32.1\%$ del control; $n=4$; $P>0.05$) ni para R2 ($81.5 \pm 24.8\%$ del control; $n=4$; $P>0.05$; Fig. 20D), lo que indica que cuando se impide la activación de los receptores NMDA, se inhibe la inserción de receptores AMPA y tampoco se producen cambios en el componente NMDA, ni en la probabilidad de liberación ni en la potencia sináptica, así como tampoco en la PPF ($n=4$; $P>0.05$; datos no mostrados).

Con el fin de comprobar que el proceso de transformación de sinapsis silentes en funcionales era un fenómeno dependiente del incremento de Ca^{2+} intracelular en la neurona postsináptica, se estudió si en presencia de BAPTA intracelular se producía conversión de las sinapsis silentes. Se realizó el mismo tipo de protocolo, añadiendo BAPTA (50 mM) a la solución intracelular, y se observó que tras el protocolo de apareamiento, no hubo inserción de receptores AMPA (Fig. 20B) y tampoco cambios en la amplitud del EPSC

(registrado a +60 mV), ni en R1 (84.6 ± 17.3 % del control; $n=7$; $P>0.05$) ni en R2 (88.7 ± 19.9 % del control; $n=7$; $P>0.05$; Fig. 20D), indicando que no hubo cambios ni en la probabilidad de liberación ni en la potencia sináptica de las respuestas NMDA.

Estos resultados confirman que el principal responsable de la transformación de las sinapsis silentes en funcionales es el incremento de Ca^{2+} intracelular. Una vez que el Ca^{2+} entra, a través de receptores NMDA, este ión puede unirse a diversas proteínas, presentes en la densidad postsináptica, que pueden desencadenar distintas cascadas de segundos mensajeros intracelulares. Con el objetivo de comprobar que la conversión de sinapsis silentes es un fenómeno que depende de la intervención de proteínas localizadas en la célula postsináptica, lo que se hizo en algunas de las sinapsis silentes registradas fue esperar 30 minutos, tras obtener acceso al interior celular, antes de comenzar con el protocolo de apareamiento. Durante este tiempo se dializó el contenido intracelular lo que evita fenómenos de LTP, dependientes de la integridad intracelular (Malinow y Tsien, 1990), y se observó que tras el protocolo de apareamiento no se produjo inserción de receptores AMPA, ni variaciones en la amplitud del EPSC promedio ($P>0.05$; $n=5$; datos no mostrados).

Una de las dianas mejor estudiada sobre las que actúa el Ca^{2+} que fluye a través de los receptores NMDA es la Ca^{2+} -Calmodulina-Kinasa II (CaMKII) (Fukunaga et al., 1993, revisado en Xia y Storm, 2005) que podría ser la responsable de desencadenar los mecanismos responsables de la transformación como son la inserción de receptores AMPA, así como de activar los mecanismos de comunicación retrograda con el terminal presináptico necesaria para la modificación de las propiedades de liberación de neurotransmisor. Para analizar si la CaMKII está mediando este fenómeno, se realizó el protocolo de apareamiento en presencia del péptido 281-309 (10 μM), bloqueante de esta proteína, añadido a la solución intracelular. En estas condiciones no se produjo inserción de receptores AMPA (Fig. 20C), y tampoco hubo incremento en la amplitud del EPSC promedio, ni en R1 (89.7 ± 14.4 % del control; $n=5$; $P>0.05$) ni en R2 (99.8 ± 20.5 % del control; $n=5$; $P>0.05$; Fig. 20D), indicando que no hubo cambios en la probabilidad de liberación, así como tampoco en la potencia sináptica de las respuestas a través de los receptores NMDA.

En conjunto todos estos resultados sugieren que aunque la conversión de las sinapsis silentes en funcionales es un fenómeno que implica tanto cambios en la densidad postsináptica como en el terminal presináptico, su inducción requiere la entrada de Ca^{2+} en la neurona postsináptica a través de los receptores NMDA y la subsiguiente activación de

la CaMKII, que, como ha sido descrito anteriormente interviene en numerosas cascadas intracelulares que participan en la regulación de la plasticidad sináptica (Xia y Storm, 2005).

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se han analizado las propiedades de liberación de los dos tipos de sinapsis glutamatérgicas (sinapsis silentes y funcionales), formadas por las CS y las neuronas piramidales de CA1, utilizadas clásicamente como modelo de estudio de la plasticidad sináptica. El concepto de que las sinapsis silentes se deben únicamente a la ausencia de receptores AMPA está siendo activamente debatido y se han planteado diferentes alternativas que podrían explicar las sinapsis silentes. Se ha propuesto que las sinapsis silentes pueden contener tanto receptores AMPA como NMDA pero no conducir por diferentes motivos: 1) debido a una probabilidad de liberación próxima a cero (“mute synapses”; Hanse y Gustafsson, 2001a; revisado en Voronin y Cherubini, 2004); o 2) porque la concentración de glutamato en la hendidura sináptica activa solo los receptores NMDA y es insuficiente para activar los receptores AMPA (Choi et al., 2000); o 3) debido al “spillover”, donde el glutamato difunde fuera de la hendidura sináptica hacia sinapsis vecinas, y esta cantidad de glutamato es suficiente para activar los receptores NMDA de las sinapsis vecinas ya que estos receptores presentan mayor afinidad (≈ 100 veces) por glutamato que los receptores AMPA (Patneau y Mayer, 1990).

En este estudio se muestra por primera vez que los terminales presinápticos de las sinapsis silentes y funcionales entre las CS y las neuronas piramidales de CA1 poseen diferentes propiedades de liberación de neurotransmisor, y que están reguladas por mecanismos presinápticos distintos. Primero, la probabilidad de liberación y la potencia sináptica son mayores en las sinapsis funcionales que en las silentes. Segundo, tanto la probabilidad de liberación como la potencia sináptica están reguladas por la LCIC en las sinapsis funcionales, mecanismo regulador que no interviene en las sinapsis silentes. Tercero, estas diferencias funcionales correlacionan bien con la divergencia en la facilitación por pares de pulsos y las diferencias en el CV_{NF} (tanto el del EPSC promedio, como el de la potencia sináptica), así como la sensibilidad colinérgica presente en las sinapsis funcionales pero no en las silentes.

Estos resultados indican que la regulación presináptica de la liberación de neurotransmisor en las sinapsis funcionales es más compleja que en las sinapsis silentes, y apoyan la hipótesis de que las sinapsis funcionales son el resultado de la maduración molecular de las sinapsis silentes “más simples” (Maggi et al., 2003; Petralia et al., 1999; Poncer y Malinow, 2001; Renger et al., 2001; Wu et al., 1996; revisado en Atwood y Wojtowicz, 1999). Esto implica que los cambios que convierten una sinapsis silente en funcional o viceversa, a través de la modificación de la expresión de los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA en la espina postsináptica durante la maduración y la

potenciación o depresión a largo plazo (LTP/LTD) (Isaac et al., 1995; Xiao et al., 2004), deben estar altamente coordinados con los cambios en el terminal presináptico (Fig. 21).

En este estudio, también se demuestra por primera vez que durante el proceso de conversión de sinapsis silentes en funcionales se producen modificaciones presinápticas y postsinápticas, ya que las sinapsis funcionales “de nueva creación”, además de la incorporación de receptores AMPA, adquieren todas las propiedades presinápticas descritas para las sinapsis funcionales. Asimismo, nuestros resultados respaldan la hipótesis de que el elemento clave de la maquinaria molecular necesaria para la expresión presináptica del tipo de sinapsis debe estar relacionado con la maduración y procesos dependientes de actividad que son disparados postsinápticamente y por lo tanto requieren una señal retrógrada aún por determinar.

1. LAS PROPIEDADES DE LIBERACIÓN SON DIFERENTES EN LAS SINAPSIS FUNCIONALES Y EN LAS SILENTES.

El estudio de las propiedades de liberación de neurotransmisor en las sinapsis glutamatérgicas establecidas entre las CS y las neuronas piramidales de CA1 reveló que las sinapsis funcionales presentan una mayor probabilidad de liberación y una mayor potencia sináptica que las sinapsis silentes, sugiriendo que se libera mayor cantidad de neurotransmisor en las sinapsis funcionales en respuesta a la invasión de un único potencial de acción generado con estimulación mínima (debe enfatizarse que artefactos causados por la posible estimulación de más de una fibra de las CS o por fallos en la activación de dichas fibras fueron improbables debido a la gran cantidad de controles y pruebas llevadas a cabo para minimizar estas posibilidades).

Los procesos celulares que determinan y regulan la cantidad de glutamato liberado por un único potencial de acción no han sido determinados. Las diferencias en la potencia sináptica del componente NMDA entre las sinapsis silentes y funcionales podrían reflejar:

a) diferencias presinápticas en el número de sitios de liberación presentes en un botón sináptico o en el número de contactos sinápticos realizados por una única fibra (Kullmann y Nicoll, 1992; Larkman et al., 1992; Sorra y Harris, 1993; Liao et al., 1995; Hsia et al., 1998);

b) un cambio en el contenido cuántico de las vesículas individuales, o un cambio en el número de vesículas liberadas (i.e., “liberación multivesicular”), o ambos (Isaac et al., 1998; de Sevilla et al., 2002; Oertner et al., 2002; Atwood y Wojtowicz, 1999);

c) la cantidad de neurotransmisor liberado por una única vesícula podría ser controlada de manera dependiente de actividad por el mecanismo conocido como “kiss-and-run” (Alvarez de Toledo et al., 1993; Stevens y Williams, 2000; Aravanis et al., 2003; Becherer et al., 2003; Gandhi y Stevens, 2003; Chen et al., 2004);

d) la liberación de neurotransmisor podría estar controlada por distintos tipos de canales de Ca^{2+} presinápticos (Iwasaki et al., 2000; Scheuber et al., 2004) en ambos tipos de sinapsis;

e) diferencias postsinápticas ligadas a diferencias en el número o tipo de receptores NMDA presentes en las espinas correspondientes (Kirson et al., 1999; Yanagisawa et al., 2002; revisado en Dumas, 2005).

Sin embargo, los presentes resultados no permiten una discriminación entre los posibles mecanismos, pero son consistentes con que los mecanismos que controlan el contenido cuántico y la probabilidad de liberación juegan un papel más importante en las sinapsis funcionales que en las silentes, explicando las diferencias en las propiedades de liberación entre ambos tipos de sinapsis.

Actualmente sigue siendo materia de debate si en un único sitio activo de liberación se libera una única vesícula o varias (Auger y Marty, 2000; Wadiche y Jahr, 2001). Se piensa que las sinapsis de las CS poseen un único sitio de liberación en animales neonatos (Bolshakov y Siegelbaum, 1995; Dobrunz y Stevens, 1997; Hanse y Gustafsson, 2001a; 2001c; 2002), pero se ha observado que después durante el desarrollo (> 1 semana) pueden mostrar un mayor número de contactos y sitios de liberación por aferente (Kullmann y Nicoll, 1992; Larkman et al., 1992; Sorra y Harris, 1993; Liao et al., 1995; Hsia et al., 1998), y también como resultado de cambios presinápticos ocurridos durante ciertas formas de LTP (Malinow y Tsien, 1990; Malinow, 1991; Bolshakov et al., 1997; Voronin et al., 1999). Por otro lado, hay estudios que muestran que los botones de las CS pueden contener uno o varios sitios de liberación o que un único axon puede hacer varios contactos con una neurona piramidal a la misma edad de los animales usados por nosotros (Harris y Stevens, 1989; Oertner et al., 2002; Conti y Lisman, 2003; revisado en Dumas, 2005). Consecuentemente, dos grupos diferentes de sinapsis funcionales, con distintas propiedades presinápticas, pero similares propiedades postsinápticas podrían coexistir en

nuestra muestra, explicando el hecho de que en un grupo de las sinapsis funcionales estudiadas la potencia sináptica de R2 fuese mayor que la de R1, mientras en otro grupo la potencia sináptica de R1 y R2 fueron similares, y que la perfusión con CCh modificase la potencia sináptica en un grupo y no en el otro. Aunque el significado fisiológico de ambos tipos de sinapsis funcionales permanece sin determinar, es concebible que las distintas propiedades de liberación podrían ser un paso intermedio en el proceso de conversión durante fases tardías de la LTP (Bolshakov et al., 1997; Palmer et al., 2004) o bien, de maduración cuando un mayor número de contactos por aferente podría estar presente (Hsia et al., 1998; revisado en Dumas, 2005), tanto porque los botones de las CS pueden expresar múltiples sitios de liberación o porque un único axon de las CS puede establecer varios contactos sinápticos con una neurona piramidal de CA1. Este paso intermedio podría estar relacionado con los diferentes estados funcionales en los que puede encontrarse una conexión sináptica (Montgomery y Madison, 2004).

El estudio de la plasticidad a corto plazo, también reveló diferencias funcionales importantes entre ambos tipos de sinapsis. Como se ha demostrado, en las sinapsis funcionales la facilitación por pulsos pareados está determinada por un incremento de la probabilidad de liberación y de la potencia sináptica del 2º EPSC (R2) con respecto al primero (R1), hecho que no ocurre en las sinapsis silentes que no presentan PPF. Las variaciones en la potencia sináptica de las sinapsis funcionales de las CS durante la PPF, también han sido descritas previamente utilizando técnicas de imagen de Ca^{2+} que garantizan el registro de una única espina dendrítica (Oertner et al., 2002; Reid et al., 2004), así como también con pares de registros de neuronas de CA3 conectadas de manera monosináptica con neuronas de CA1, método que asegura la activación de un único axon (Malinow y Tsien, 1990; Foster y McNaughton, 1991; Malinow, 1991; Debanne et al., 1996; Chen et al., 2004).

Además se observó que la potencia sináptica del 2º EPSC (R2) fue similar cuando se calculó con las respuestas que presentaron una respuesta previa al primer estímulo o con aquellas respuestas que no presentaron respuesta en R1, y las distribuciones de probabilidad acumulada del pico de amplitud de R2 fueron idénticas en presencia o ausencia de R1. Este resultado puede ser interpretado como indicativo de la ausencia de un efecto postsináptico en la regulación de la potencia sináptica durante la PPF. Este hallazgo contradice resultados previos en los cuales se muestra que cuando hay respuesta en R1 se produce una reducción del conjunto de vesículas listo para liberar (RRP), dejando menos vesículas para liberar cuando el segundo potencial de acción invade el terminal

presináptico, reduciendo la probabilidad de liberación durante el segundo pulso (Stevens y Wang, 1994; Debanne et al., 1996; Dobrunz y Stevens, 1997). Esta discrepancia puede indicar que la liberación no afecta de manera crítica el tamaño del RRP en nuestras condiciones experimentales. Una posibilidad que podría explicar estas discrepancias es que la activación de un único aferente de las CS puede reclutar varios sitios de liberación con baja probabilidad de liberación en cada uno de los sitios de manera que no se reduciría de manera apreciable el tamaño del RRP en cada uno de los sitios de liberación. De hecho, la relación entre la liberación y el RRP es materia de debate, ya que hay tanto observaciones de que R2 no cambia, como de una disminución de este 2º EPSC cuando hay una primera respuesta en R1 (Stevens y Wang, 1994; Debanne et al., 1996; Dobrunz y Stevens, 1997; Hanse y Gustafson, 2001a-c; 2002).

En animales neonatales (< 1 semana) la proporción AMPA/NMDA es baja (≈ 0.2), sugiriendo que la mayoría de las sinapsis son silentes (Hsia et al., 1998). Estas sinapsis no presentan PPF, resultado que está de acuerdo con nuestros resultados. Sin embargo, la explicación que subyace a este comportamiento neonatal es incierta ya que la ausencia de PPF ha sido relacionada con una mayor probabilidad de liberación en estas sinapsis (Bolshakov y Siegelbaum, 1995), hecho que no ocurre en nuestras observaciones.

La discrepancia entre nuestros resultados y los resultados de Bolshakov y Siegelbaum (1995) podrían indicar que en nuestra muestra, en la que las ratas son de mayor edad, las sinapsis silentes sufren cambios relacionados con procesos de maduración, como ocurre en las sinapsis talamocorticales (Yanagisawa et al., 2004) y también en las sinapsis en hipocampo alrededor de la segunda y tercera semana postnatal (revisado en Dumas, 2005).

2. REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR EN LAS SINAPSIS SILENTES Y FUNCIONALES.

La contribución de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} , como el RE, y la LCIC, a la liberación de neurotransmisor en las sinapsis del SNC es materia de debate, y se han encontrado tanto resultados positivos (Llano et al., 2000; Emptage et al., 2001; Galante y Marty, 2003; Martín y Buño, 2003) como negativos (Carter et al., 2002). Además, también se han publicado resultados contradictorios en cuanto a la contribución de la LCIC en los contactos de las CS con las neuronas piramidales de CA1, donde se ha visto tanto que ryanodina a bajas concentraciones no tiene efecto, como que a más altas concentraciones (como las usadas por nosotros, 100 μM) disminuye el EPSC (Carter et al., 2002).

Consistente con nuestros resultados, el efecto inhibitorio de ryanodina (y thapsigargina) sobre los EPSCs ha sido previamente demostrado en sinapsis inhibitorias cerebelosas y ha sido interpretado como consecuencia de una disminución de la sensibilidad a Ca^{2+} del mecanismo de exocitosis vesicular producido por una reducción local de la concentración basal de Ca^{2+} en el terminal (Galante y Marty, 2003). Sin embargo, no hay constancia de ningún estudio previo en el que se analice el papel de la LCIC separadamente en las sinapsis silentes y en las funcionales que pudiesen mostrar diferencias en la regulación de los reservorios de Ca^{2+} del RE.

Nuestros resultados muestran que tanto ryanodina como thapsigargina redujeron la probabilidad de liberación, la potencia sináptica, y la PPF en las sinapsis funcionales. Cafeína tuvo efectos contrarios sobre la probabilidad de liberación y la potencia sináptica, pero también disminuyó la PPF, de acuerdo con la correlación negativa entre la probabilidad de liberación y la PPF que caracteriza la mayoría de las sinapsis (e.g., Dobrunz y Stevens, 1997; Oertner et al., 2002). Estos resultados sugieren que la LCIC cumple un papel importante en la regulación de la liberación de glutamato, a través de la amplificación de la señal de Ca^{2+} inducida por la llegada del potencial de acción. En contraste, las sinapsis silentes fueron insensibles a estas modificaciones sugiriendo que la señal de Ca^{2+} de los reservorios no juega un papel importante en la regulación de la liberación de glutamato en estas sinapsis, bien porque los reservorios de Ca^{2+} no están presentes en estos terminales, o aunque estén presentes no son sensibles a estas manipulaciones, o no intervienen en la regulación de la liberación de glutamato.

Cafeína a concentraciones en el rango de mM incrementa la sensibilidad a Ca^{2+} de los RyRs, amplificando la LCIC (Llano et al., 2000; Galante y Marty, 2003; Martín y Buño, 2003). Cafeína también incrementa el influjo de Ca^{2+} a través de los canales de tipo N localizados en el terminal presináptico a través de la inhibición de los receptores presinápticos de adenosina, liberando a los canales de tipo N del bloqueo mediado por estos receptores (Qian y Saggau, 1997; Martín y Buño, 2003). Sin embargo, hemos demostrado previamente que tanto el componente NMDA como el no-NMDA del EPSC evocado por estimulación convencional de las CS fueron bloqueados en un grado similar por adenosina (de Sevilla et al., 2002), por tanto, los efectos diferenciales de cafeína sobre las sinapsis silentes y funcionales descritos en los resultados son principalmente debidos a un efecto específico sobre los reservorios del RE y los mecanismos de LCIC.

Resultados previos obtenidos por otros grupos muestran que el bloqueo de la LCIC puede reducir efectivamente la señal de Ca^{2+} en los terminales sinápticos de las CS

evocados por la llegada de ambos potenciales de acción durante la estimulación con pares de pulsos (Emptage et al., 2001). En vista de estos resultados se ha argumentado que en condiciones normales la señal de Ca^{2+} procedente de la LCIC causada por el primer potencial de acción que invade el terminal, puede perdurar el tiempo suficiente para incrementar la PPF añadiéndose al influjo de Ca^{2+} provocado por la llegada del segundo potencial de acción, o sensibilizando el aparato de liberación a un estímulo subsiguiente. Sin embargo, los efectos de ryanodina y thapsigargina que nosotros presentamos pueden reflejar no solamente las consecuencias del bloqueo de la LCIC, si no, que estas drogas pueden vaciar los reservorios de Ca^{2+} del RE, permitiendo en última instancia una reducción de la concentración de Ca^{2+} citoplásmico en el terminal presináptico, lo que podría explicar el efecto en la liberación por un único potencial de acción (Galante y Marty, 2003). Esto podría explicar la facilitación reducida que hemos observado.

De la misma manera, el efecto de cafeína 10 mM en la liberación por una única espiga podría ser debido a un incremento en la concentración basal de Ca^{2+} presináptico, como sería de esperar cuando los reservorios del RE están implicados en la liberación en respuesta al primer estímulo, además si ésta respuesta es saturante la facilitación se vería reducida como se ha observado que ocurre en estos experimentos.

Sea cual sea el mecanismo de acción de ryanodina y cafeína sobre las sinapsis funcionales, hay que destacar que estos efectos están ausentes en las sinapsis silentes, sugiriendo que la regulación de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} presinápticos juegan un papel importante en el control de la liberación de neurotransmisor en las sinapsis funcionales pero no así en las silentes.

3. REGULACIÓN COLINÉRGICA DIFERENCIAL DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR: IMPLICACIONES FUNCIONALES.

El sistema colinérgico es esencial en los procesos cognitivos de atención, así como en los procesos de memoria (Aigner et al., 1995; Anagnostaras et al., 2003; Hasselmo, 1999). La activación de los receptores muscarínicos por ACh incrementa la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1 debido al bloqueo de algunas conductancias de K^{+} (Benardo y Prince, 1982; Borde et al., 2000). Además, el componente no-NMDA de los EPSCs de las CS es selectivamente inhibido, dada la reducción de la probabilidad de liberación y el contenido cuántico en las sinapsis funcionales de las CS, sin que se vean afectados los terminales de las sinapsis silentes de las CS (de Sevilla et al., 2002). Por tanto, la activación concurrente de las entradas colinérgicas y las neuronas piramidales de

CA3 podría inducir: primero, una activación preferente de los receptores NMDA con respecto a los no-NMDA a través de la inhibición selectiva de la liberación de glutamato en los terminales funcionales de las sinapsis entre las CS y las neuronas piramidales de CA1; y segundo, una despolarización de las neuronas piramidales de CA1. En este escenario, la entrada colinérgica podría desconectar las sinapsis funcionales maduras y potenciadas, favoreciendo la transmisión a través de las sinapsis silentes inmaduras y no-potenciadas. Las consecuencias de esta “ruta preferencial” de actividad a través de las sinapsis silentes podrían inducir su maduración y favorecer su potenciación por su conversión en sinapsis funcionales.

4. CONVERSIÓN DE SINAPSIS SILENTES EN FUNCIONALES.

A pesar de que los resultados aquí descritos son consistentes con el escenario clásico donde las sinapsis silentes no presentan receptores AMPA y podrían considerarse “condicionalmente silentes” o “sordas”, también se observan diferencias presinápticas entre ambos tipos de sinapsis, apoyando la hipótesis de que estas sinapsis silentes son pre y postsinápticamente diferentes de las sinapsis funcionales.

Esto implicaría que los mecanismos de plasticidad sináptica no son exclusivamente pre o postsinápticos, sino que deben involucrar un balance e integración de influencias recíprocas en el desarrollo y maduración de la maquinaria sináptica a ambos lados de la hendidura sináptica. Así pues, una consecuencia funcional de estos resultados es que la conversión de las sinapsis silentes en funcionales que ocurre durante procesos de maduración y LTP debe estar asociada con modificaciones de los terminales presinápticos (Malinow, 1991; Bolshakov et al., 1997; Voronin et al., 1999; Palmer et al., 2004; Stanton et al., 2005; Dumas, 2005).

El presente trabajo confirma que la conversión de sinapsis silentes en funcionales implica tanto inserción de receptores AMPA postsinápticos, como modificaciones del terminal presináptico, que hacen que estas sinapsis adquieran todas las propiedades de las sinapsis funcionales “típicas” en un corto periodo de tiempo. Estas propiedades son el incremento de la probabilidad de liberación, la adquisición de PPF, debida tanto a un incremento en la probabilidad de liberación de R2, como a un aumento de la potencia sináptica de éste 2º EPSC, y la ganancia de sensibilidad a mecanismos de regulación colinérgicos. Por tanto la transformación de sinapsis silentes en funcionales es un proceso complejo y preciso, que le confiere gran plasticidad al sistema.

Además los resultados obtenidos con estimulación convencional de las CS muestran que la conversión de las sinapsis silentes en funcionales es uno de los mecanismos responsables de ciertas formas de LTP, tal y como se había sugerido anteriormente (revisado en Kullmann, 2003). Se observó que el CV antes de la LTP es mayor para las respuestas mediadas por receptores AMPA que para las mediadas por receptores NMDA, indicando que a potenciales despolarizados están siendo registradas mayor número de sinapsis, que no son detectadas en el potencial de reposo. Tras la LTP el CV del componente AMPA se reduce significativamente haciéndose similar al del componente NMDA. De acuerdo con lo descrito por otros autores (Kullmann, 1994), estos resultados confirman el hecho de que durante el proceso de inducción de LTP hay aferentes previamente silentes, que se convierten en funcionales.

Estos estudios junto con el análisis de la variación del $1/CV^2$ antes y después de la potenciación, y con los resultados obtenidos con estimulación “mínima”, demuestran que los cambios observados en las respuestas mediadas por receptores AMPA son debidos, además de a la inserción de nuevos receptores, a la modificación de las propiedades de liberación de los terminales presinápticos.

Existen evidencias previas demostrando que la inserción de receptores AMPA postsinápticos durante la conversión de sinapsis silentes en funcionales, con la LTP, es un proceso dependiente de la entrada de Ca^{2+} por los receptores NMDA (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995). Debido a que en el presente estudio se demuestra por primera vez, que, acompañando a esta inserción, se producen también cambios presinápticos, se estudió si estos cambios necesitan ser disparados postsinápticamente o se producen independientemente de la potenciación postsináptica. Los resultados obtenidos demuestran que la transformación presináptica de sinapsis silentes en funcionales requiere de la activación de mecanismos postsinápticos.

Uno de los principales sensores de Ca^{2+} postsináptico es la CaMKII (Fukunaga et al., 1993; revisado en Xia y Storm, 2005), y en numerosos estudios ha sido propuesto como uno de los responsables de la inducción de la LTP (revisado en Malenka y Bear, 2004). También se ha observado que en estados postnatales tempranos (< 9 días postnatal) su expresión está reducida y por tanto debe haber otras moléculas responsables de la inducción de LTP (Kirkwood et al., 1997; Yasuda et al., 2003), y no es hasta estados más tardíos (entre P14 y P20) cuando la expresión de CaMKII aumenta. En el caso de los resultados aquí presentados, donde la edad de las ratas estaba comprendida entre 11-16

días, se observó que la CaMKII interviene en el proceso de conversión de sinapsis silentes en funcionales, y parece ser responsable tanto de la aparición de respuestas mediadas por receptores AMPA, como de las modificaciones del terminal presináptico.

Como consecuencia de estos resultados podría esperarse que la inducción de la LTP, que depende del influjo de Ca^{2+} a través de los receptores de tipo NMDA, y la consecuente expresión de una respuesta mediada por receptores de tipo AMPA en una sinapsis previamente silente debe ir seguida por un mecanismo de señalización retrógrada, aún desconocido, que “traslade” la señal postsináptica al terminal presináptico durante la conversión de sinapsis silentes en funcionales. Las modificaciones presinápticas resultantes podrían explicar el aumento en la probabilidad de liberación y el contenido cuántico observado durante la maduración y la LTP tanto en las sinapsis de las CS como en las de las fibras musgosas (Bekkers y Stevens, 1990; Malinow y Tsien, 1990; Durand et al., 1996; Wang y Kelly, 1997; Sokolov et al., 1998; Choi et al., 2000; Poncer y Malinow, 2001; Renger et al., 2001; Emptage et al., 2003; Reid et al., 2004; para una revisión reciente ver Atwood y Wojtowicz, 1999; Voronin y Cherubini, 2004).

El eslabón que conecta las propiedades pre y postsinápticas debe necesitar una señal desconocida que modifique el terminal, y que podría provenir de la neurona postsináptica. Aunque son numerosos los candidatos propuestos, como son el óxido nítrico (NO), el ácido araquidónico, y algunas neurotrofinas como el BDNF, aún no se han encontrado claras evidencias de la implicación de ninguno de ellos en esta señalización retrógrada. Otro posible candidato podrían ser los astrocitos adyacentes, ya que recientemente se ha sugerido que estas células, tradicionalmente consideradas únicamente como células de soporte, están íntimamente ligadas a las sinapsis (Araque y Perea, 2004) y posiblemente jueguen un papel importante en el procesamiento de información en el sistema nervioso central.

Finalmente, enfatizar que la conversión de sinapsis silentes en funcionales es un fenómeno que parece de gran relevancia funcional, no sólo por ser el sustrato celular de la LTP, sino además porque le confiere al sistema mayor capacidad de integración y procesamiento de la información, debido a que estas nuevas sinapsis funcionales adquieren mayor posibilidad de regulación, así como plasticidad a corto plazo, que no presentaban en la situación silente. Sin embargo, este proceso debe estar altamente regulado, y debe ser susceptible de control y reversión, ya sea por fenómenos de LTD o por modulación de la excitabilidad postsináptica, de otro modo esto podría incrementar la ganancia sináptica

hasta niveles donde la saturación de la transmisión sináptica, o un incremento anormal de la excitabilidad podrían perjudicar el funcionamiento normal del sistema.

VI. CONCLUSIONES

1. Los agonistas colinérgicos muscarínicos regulan de manera diferencial la liberación de glutamato en las sinapsis funcionales y silentes de hipocampo.
2. La probabilidad de liberación y la potencia sináptica son mayores en las sinapsis funcionales que en las silentes. Asimismo, las sinapsis funcionales presentan mecanismos de plasticidad a corto plazo, como la PPF, ausentes en las sinapsis silentes.
3. La LCIC y los reservorios intracelulares de Ca^{2+} intervienen en la regulación de la liberación de glutamato y la plasticidad a corto plazo en las sinapsis funcionales, sin expresarse en las silentes.
4. La cantidad de neurotransmisor liberado es un proceso más finamente regulado en las sinapsis funcionales que en las silentes.
5. Durante la conversión de sinapsis silentes en funcionales se produce tanto inserción de receptores AMPA, como cambios en las propiedades de liberación del terminal presináptico.
6. Las sinapsis funcionales de nueva creación adquieren en un corto periodo de tiempo sensibilidad a la regulación por agonistas colinérgicos muscarínicos.
7. La transformación de sinapsis silentes depende de la activación de NMDAR, de Ca^{2+} intracelular y de la activación de CaMKII postsináptica.
8. La transformación de sinapsis silentes en funcionales implica cambios pre y postsinápticos y por tanto necesita de una señal que comunique ambos elementos, aún por determinar.

VII. REFERENCIAS

- Aigner, T. G. (1995). Pharmacology of memory: cholinergic-glutamatergic interactions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 155-160.
- Akert, K., Pfenninger, K., Sandra, C., y Moor, H. (1972). Freeze etching and cytochemistry of vesicles and membrane complexes in synapses of the central nervous system. In: *Structure and Function of Synapses*, eds. G. D. Pappas y D. P. Purpura, pp 67-86. New York: Raven Press.
- Alonso, J. R., y Amaral, D. G. (1995). Cholinergic innervation of the primate hippocampal formation. I. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta* monkeys. *J.Comp. Neurol.* 1, 135-170
- Alvarez de Toledo, G., Fernandez-Chacon, R., Fernandez, J.M. (1993). Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* 363(6429), 554-8.
- Anagnostaras, S. G., Murphy, G. G., Hamilton, S. E., Mitchell, S. L., Rahnema, N. P., Nathanson, N. M., y Silva, A. J. (2003). Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat. Neurosci.* 6, 51-58.
- Andersen, P., Bliss, T. V. P., y Skrede, K. (1971). Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp. Brain Res.* 13, 222-238.
- Araque, A., Perea, G. (2004). Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia* 47(3), 241-8.
- Aravanis, A. M., Pyle, J. L., y Tsien, R. W. (2003). Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature* 423, 643-647.
- Atwood, H. L. (1976). Organization and synaptic physiology of crustacean neuro-muscular systems. *Prog. Neurobiol.* 7, 291-391.
- Atwood, H. L., y Wojtowicz, J. M. (1999). Silent synapses in neuronal plasticity: Current evidence. *Learn. and Mem.* 6, 542-571.
- Auger, C., Kondo, S., y Marty, A. (1998). Multivesicular release at single functional synaptic sites in cerebellar stellate and basket cells. *J Neurosci.* 18(12), 4532-4547.
- Auger, C., y Marty A. (2000). Quantal currents at single-site central synapses. *J Physiol (Lond.)* 526, 3-11.
- Augustine, J., Adler, E. M., y Charlton, M. P. (1991). The calcium signal for transmitter secretion from presynaptic nerve terminals. *Annals NY Acad. Sci.* 635, 365-381.
- Becherer, U., Moser, T., Stuhmer, W., y Oheim, M. (2003). Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nat. Neurosci.* 6, 846-853.
- Bekkers, J. M., y Stevens, C. F. (1990). Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 346, 724-729.

- Benardo, L. S., y Prince, D. A. (1982). Dopamine modulates a Ca^{2+} -activated potassium conductance in mammalian hippocampal pyramidal cells. *Nature*. 297, 76-9.
- Bliss, T.V., y Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361(6407), 31-39.
- Bolshakov, V. Y., Golan, H., Kandel, E. R., y Siegelbaum, S. A. (1997). Recruitment of new sites of synaptic transmission during the cAMP-dependent late phase of LTP at CA1-CA3 synapses in hippocampus. *Neuron* 19, 635-651.
- Bolshakov, V. Y., y Siegelbaum, S. A. (1995). Hippocampal long-term depression: arachidonic acid as a potential retrograde messenger. *Neuropharmacol* 34, 1581-7.
- Borde, M., Bonansco, C., de Sevilla, D. F., Le Ray, D., y Buno, W. (2000). Voltage-clamp analysis of the potentiation of the slow Ca^{2+} -activated K^{+} current in hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus* 10, 198-206.
- Cabezas, C., y Buno, W. (2006). Distinct transmitter release properties determines differences in short-term plasticity at functional and silent synapses. *J Neurophysiol*. 95(5), 3024-3034.
- Cajal, S. R. (1909, 1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris : Maloine.
- Carter, A.G., Vogt, K. E., Foster, K. A., y Regehr, W. G. (2002). Assessing the role of calcium-induced calcium release in short-term presynaptic plasticity at excitatory central synapses. *J Neurosci* 22, 21-28.
- Cavazzini, M., Bliss, T., Emptage, N. (2005). Ca^{2+} and synaptic plasticity. *Cell Calcium*. 38(3-4), 355-67.
- Chen, G., Harata, N. C., y Tsien, R. W. (2004). Paired-pulse depression of unitary quantal amplitude at single hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 1063-1068.
- Choi, S., Klingauf, J., y Tsien, R. W. (2000). Postfusional regulation of cleft glutamate concentration during LTP at 'silent synapses'. *Nat. Neurosci.* 3, 330-336.
- Clementi, E., Scheer, H., Zacchetti, D., Fasolato, C., Pozzan, T., y Meldolesi, J. (1992). Receptor-activated Ca^{2+} influx. Two independently regulated mechanisms of influx stimulation coexist in neurosecretory PC12 cells. *J. Biol. Chem*. 267, 2164-2172.
- Collingridge, G. L., Kehl, S. J., McLennan, H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol*. 334, 33-46.

- Collingridge, G. L., y Watkins, J. C. (eds.). (1994). *The NMDA Receptors*. New York University Press.
- Conti, R., y Lisman, J. (2003). The high variance of AMPA receptor- and NMDA receptor-mediated responses at single hippocampal synapses: evidence for multiquantal release. *Proc Natl Acad Sci USA* *100*, 4885-4890.
- Couteaux, R. y Pécot-Dechavassine, M. (1970). Vésicules synaptiques et poches au niveau des zones actives de la jonction neuro-musculaire. *C R Séances Acad. Sci. (Séries D)* *271*, 2346-2349.
- Couteaux, R. y Pécot-Dechavassine, M. (1970). L'ouverture des vésicules synaptiques au niveau des zones actives. In : *Microscopie Electronique*, vol III, ed. P. Farvard, pp 709-710. Grenoble: Seventh International Congress of Electron Microscopy.
- Creager, R., Dunwiddie, T., y Lynch, G. (1980). Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus. *J. Physiol.* *299*, 409-424.
- Christie, J. M., y Jahr, C. E. (2006). Multivesicular release at Schaffer collateral-CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci.*, *26(1)*, 210-216.
- Debanne, D., Guérineau, N. C., Gähwiler, B. H., y Thompson, S. M. (1995). Physiology and pharmacology of unitary synaptic connections between pairs of cells in areas CA3 and CA1 of rat hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol* *73*, 1282-1294.
- Debanne, D., Guérineau, N. C., Gähwiler, B.H., y Thompson, S. M. (1996). Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J Physiol* *491*, 163-176.
- De Sevilla, D. F., Cabezas, C., Ochima de Prada, A. N., Sanchez-Jimenez, A., y Buño, W. (2002). Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol.* *545*, 51-63.
- Dobrunz, L. E. (2002). Release probability is regulated by the size of the readily releasable vesicle pool at excitatory synapses in hippocampus. *Int J Dev Neurosc* *20*, 225-236.
- Dobrunz, L.E., Huang, E. P., y Stevens, C.F. (1997). Very short-term plasticity in hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94(26)*, 14843-14847.
- Dobrunz, L. E., y Stevens, C. F. (1997). Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* *18*, 995-1008.
- Dodge, F. A., y Rahamimoff, R. (1967). Co-operative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J. Physiol.* *193*, 419-432.

- Dolphin, A. C., Errington, M.L., y Bliss, T. V. (1982). Long-term potentiation of the perforant path in vivo is associated with increased glutamate release. *Nature*. 297(5866), 496-498.
- Dumas, T. C. (2005). Late postnatal maturation of excitatory synaptic transmission permits adult-like expression of hippocampal-dependent behaviors. *Hippocampus* 15, 562-578.
- Durand, G. M., Kovalchuk, Y., y Konnerth, A. (1996). Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381, 71-75.
- Emptage, N. J, Reid, C. A., y Fine, A. (2001). Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca²⁺ entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron* 29, 197-208.
- Emptage, N. J., Reid, C. A., Fine, A., y Bliss, T. V. (2003). Optical quantal analysis reveals a presynaptic component of LTP at hippocampal Schaffer-associational synapses. *Neuron*. 38, 797-804.
- Engel, D., Pahner, I., Schulze, K., Frahm, C., Jarry, H., Ahnert-Hilger, G., y Draguhn, A., (2001). Plasticity of rat central inhibitory synapses through GABA metabolism. *J. Physiol.* 535, 473-82.
- Faber, D. S., y Korn, H. (1991). Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *Biophys J* 60, 1288-1294.
- Fernández de Sevilla, D., y Buño, W. (2003). Presynaptic inhibition of Schaffer collateral synapses by stimulation of hippocampal cholinergic afferent fibres. *Eur. J. Neurosci.* 17, 555-558.
- Foster, T.C., y McNaughton, B.L. (1991). Long-term enhancement of CA1 synaptic transmission is due to increased quantal size, not quantal content. *Hippocampus*. 1, 79-91.
- Foster, M., y Sherrington, C.S. (1897). A text book of Physiology. Part III: The Central Nervous System. 7th edition. London:Macmillan.
- Fredholm, B.B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A., y Zwartau, E.E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 51, 83-133.
- Frotscher, M., y Leranth, C. (1985). Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 239, 237-246.

- Fukunaga, K., Stoppini, L., Miyamoto, E., y Muller, D. (1993). Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 268(11), 7863-7867.
- Galante, M., y Marty, A. (2003). Presynaptic ryanodine-sensitive calcium stores contribute to evoked neurotransmitter release at the basket cell-Purkinje cell synapse. *J. Neurosci.* 23, 11229-11234.
- Gandhi, S. P., y Stevens, C. F. (2003). Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature* 423, 607-613.
- Gasparini, S., Saviane, C., Voronin, L. L., y Cherubini, E. (2000). Silent synapses in the developing hippocampus: lack of functional AMPA receptors or low probability of glutamate release?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9741-9746.
- Goda, Y., y Stevens, C. F. (1996). Synaptic plasticity: the basis of particular types of learning. *Curr. Biol.* 6, 375-378.
- Hanse, E., y Gustafsson, B. (2001a) Quantal variability at glutamatergic synapses in area CA1 of the rat neonatal hippocampus. *J Physiol* 531, 467-480.
- Hanse, E., y Gustafsson, B. (2001b). Factors explaining heterogeneity in short-term synaptic dynamics of hippocampal glutamatergic synapses in the neonatal rat. *J Physiol* 537, 141-149.
- Hanse, E., y Gustafsson, B. (2001c). Paired-pulse plasticity at the single release site level: An experimental and computational study. *J Neurosci* 21, 8362-9369.
- Hanse, E., y Gustafsson, B. (2002). Release dependence to a paired-stimulus at a synaptic release site with a small variable pool of immediately releasable vesicles. *J Neurosci* 22, 4381-4387.
- Harris, K. M., y Stevens, J. K. (1989). Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9, 2982-2997.
- Hasselmo, M. E. (1999). Neuromodulation: Acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn. Sci.* 3, 351-359.
- Herreras, O., Solís, J. M., Herranz, A. S., Martín del Río, R., y Lerma, J. (1988). Sensory modulation of hippocampal transmission. II. Evidence for a cholinergic locus of inhibition in the Schaffer-CA1 synapse. *Brain Res.* 461(2), 303-313.
- Hess, G., Kuhnt, U., y Voronin, L. L. (1987). Quantal analysis of paired-pulse facilitation in guinea pig hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 77, 187-192.

- Hicks, T. P., Lodge, D., y McLennan, H. eds. (1987). *Excitatory Amino Acids Transmission*. New York: Alan R. Liss.
- Hikosaka, O. y Wurtz, R. H. 1983. Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata. III. Memory-contingent visual and saccade responses. *J. Neurophysiol.* 49, 1268-1284.
- Hsia, A. Y., Malenka, R. C., y Nicoll, R. A. (1998). Development of excitatory circuitry in the hippocampus. *J Neurophysiol* 79, 2013-24.
- Hounsgaard, J. (1978). Presynaptic inhibitory action of acetylcholine in area CA1 of the hippocampus. *Exp. Neurol.* 62, 787-797.
- Isaac, J. T. (2003) Postsynaptic silent synapses: evidence and mechanisms. *Neuropharmacol.* 45, 450-460.
- Isaac, J. T., Nicoll, R. A., y Malenka, R. C. (1995). Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15, 427-434.
- Iwasaki, S., Momiyama, A., Uchitel, O. D., y Takahashi, T. (2000). Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J Neurosci* 20, 59-65.
- Jahr, C. E., Stevens, C. F. (1987). Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. *Nature.* 325(6104), 522-525.
- Johnston, D., y Amaral, D. G. (1998). *Hippocampus. The Synaptic Organization of the Brain*. Shepherd, G. M. ed. (New York, Oxford University Press). pp. 417-458.
- Kamiya, H., y Zucker, R. S. (1994). Residual Ca²⁺ in short-term plasticity. *Nature* 371, 603-606.
- Katz, B., y Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol* 195: 481-492.
- Kirson, E. D., Schirra, C., Konnerth, A., y Yaari, Y. (1999). Early postnatal switch in magnesium sensitivity of NMDA receptors in rat CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 521, 99-111.
- Kirkwood, A., Silva, A., y Bear, M. F. (1997). Age-dependent decrease of synaptic plasticity in the neocortex of alphaCaMKII mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(7), 3380-3383.
- Korn, H., y Faber, D. S. (1987). Regulation and significance of probabilistic release mechanisms at central synapses. In: *Synaptic Function*, eds. G. M. Edelman, W. E. Gall, y W. M. Cowan, pp 57-108. New York: John Wiley and Sons.

- Kullmann, D. M., (1994). Amplitude fluctuations of dual-component EPSCs in hippocampal pyramidal cells: implications for long-term potentiation. *Neuron*. 12(5), 1111-1120.
- Kullmann, D. M., (2003). Silent synapses: what are they telling us about long-term potentiation? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 358(1432), 7277-33.
- Kullmann, D. M., y Asztely, F. (1998). Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: evidence and implications. *Trends Neurosci*. 21, 8-14.
- Kullmann, D. M., y Nicoll, R. A. (1992). Long-term potentiation is associated with increases in quantal content and quantal amplitude. *Nature* 357, 240-244.
- Larkman, A., Hannay, T., Stratford, K., y Jack, J. (1992). Presynaptic release probability influences the locus of long-term potentiation. *Nature* 360, 70-73.
- Lewis, P. R., y Shute, C. C. (1967). The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain*. 90, 521-540.
- Liao, D., Hessler, N. A., y Malinow, R. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375, 400-404.
- Lisman, J. (2003). Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 358(1432), 829-842.
- Liu, G., Choi, S., y Tsien, R.W. (1999). Variability of neurotransmitter concentration and nonsaturation of postsynaptic AMPA receptors at synapses in hippocampal cultures and slices. *Neuron* 22, 395-409.
- Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex II. Contribution of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol*. 46, 113-177.
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., y Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*. 305(5936), 719-721.
- Llano, I., González, J., Caputo, C., Lai, F. A., Blayney, L. M., Tan, Y. P., y Marty, A. (2000). Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nat. Neurosci*. 3, 1256-65.
- MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., y Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*. 321(6069), 519-522.

- Madison, D. V., Malenka, R. C., y Nicoll, R. A. (1991). Mechanisms underlying long-term potentiation of synaptic transmission. *Annual Review of Neuroscience* 14, 379-397.
- Maggi, L., Le Magueresse, C., Changeux, J. P., y Cherubini, E. (2003). Nicotine activates immature "silent" connections in the developing hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2059-2064.
- Malenka, R. C., y Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44(1), 5-21.
- Malinow, R.(1991). Transmission between pairs of hippocampal slice neurons: quantal levels, oscillations, and LTP. *Science* 252, 722-4.
- Malinow, R.(2003). AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358(1432), 707-714.
- Malinow, R., Mainen, Z. F., y Hayashi, Y. (2000). LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic. *Curr Opin Neurobiol.* 10(3), 352-7
- Malinow, R., y Miller, J. P. (1986). Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation. *Nature* 320(6062), 529-530.
- Malinow, R., y Tsien, R. W. (1990). Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation. *Nature* 346, 177-180.
- Manabe, T., Wyllie, D. J., Perkel, D. J., y Nicoll, R. A. (1993). Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurophysiol.* 70(4), 1451-1459
- Martín, E. D., y Buño, W. (2003). Caffeine-mediated presynaptic long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 89, 3029-3038.
- Montgomery, M. M., y Madison, D. V. (2004). Discrete synaptic states define a major mechanism of synapse plasticity. *TRENDS in Neuroscience* 27, 744-750.
- Murthy, V. N., Sejnowsky, T. J., y Stevens, C. F. (1997). Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron* 18, 599-612.
- Nicoll, R. A. (2003). Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 358, 721-726.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., y Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature.* 307(5950), 462-465.
- Nusser, Z., Cull-Candy, S., y Farrant, M. (1997). Differences in synaptic GABA (A) receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron* 19, 697-709.

- Oertner, T. G., Sabatini, B. L., Nimchinsky, E. A., y Svoboda, K. (2002). Facilitation at single synapses probed with optical quantal analysis. *Nat. Neurosci.* 5, 657-664.
- Palay, L. (1958). The morphology of synapses in the central nervous system. *Exp. Cell. Res (Suppl)* 5, 275-293.
- Palmer, M. J., Isaac, J. T. R., y Collingridge, G. L. (2004). Multiple, developmentally regulated expression mechanisms of long-term potentiation at CA1 synapses. *J Neurosci* 24, 4903-4911.
- Pasquier, D. A., y Reinoso-Suarez, F. (1978). The topographic organization of hypothalamic and brain stem projections to the hippocampus. *Brain Res. Bull.* 3(4), 373-389.
- Patneau, D. K., y Mayer, M. L. (1990). Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J Neurosci.* 10(7), 2385-2399.
- Peters, S. L., Palay, S. L., Webster, H de F. (1991). The fine structure of the neurons system: neurons and supporting cells, 3rd edition. Oxford: oxford university press.
- Petralia, R. S., Esteban, J. A., Wang, Y. X., Partridge, J. G., Zhao, H. M., Wenthold, R. J., y Malinow, R. (1999). Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. *Nat. Neurosci.* 2, 31-36.
- Poncer, J. C., y Malinow, R. (2001). Postsynaptic conversion of silent synapses during LTP affects synaptic gain and transmission dynamics. *Nat. Neurosci.* 10, 989-96.
- Porter, C. W., Barnard, E. A., y Chiu, T. H. (1973). The ultrastructural localization and quantitation of cholinergic receptors at the mouse motor endplate. *J. Membr. Biol.* 14, 383-402.
- Qian, J., y Saggau, P. (1997). Presynaptic inhibition of synaptic transmission in the rat hippocampus by activation of muscarinic receptors: involvement of presynaptic calcium influx. *Brit. J. Pharmacol.* 122, 511-519.
- Raastad, M. (1995). Extracellular activation of unitary excitatory synapses between hippocampal CA3 and CA1 pyramidal cells. *Eur J Neurosci* 7, 1882-1888.
- Reid, C. A., Dixon D. B., Takahashi, M., Bliss, T. V., y Fine, A. (2004) Optical quantal analysis indicates that long-term potentiation at single hippocampal mossy fiber synapses is expressed through increased release probability, recruitment of new release sites, and activation of silent synapses. *J. Neurosci.* 24, 3618-3626.

- Renger, J. J., Egles, C., y Liu, G. (2001). A developmental switch in neurotransmitter flux enhances synaptic efficacy by affecting AMPA receptor activation. *Neuron* 29, 469-484.
- Roberts, P. J., Storm-Mathisen, J., y Johnston, G. A. R. (1981). Glutamate transmission in the central nervous system. Chichester: John Wiley & Sons.
- Saviane, C., Savtchenko, L. P., Raffaelli, G., Voronin, L. L., y Cherubini, E. (2002). Frequency-dependent shift from paired-pulse facilitation to paired-pulse depression at unitary CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 544, 469-476.
- Scheuber, A., Miles, R., y Poncer, J. C. (2004). Presynaptic Cav2.1 and Cav2.2 differentially influence release dynamics at hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 25, 10402-10409.
- Sheridan, R.D., y Sutor, B. (1990). Presynaptic M1 muscarinic cholinceptors mediate inhibition of excitatory synaptic transmission in the hippocampus in vitro. *Neurosci Lett.* 108, 273-278.
- Sokolov, M. V., Rossokhin, A. V., Behnisch, T., Reymann, K. G., y Voronin, L. L. (1998). Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation of minimal excitatory postsynaptic potentials in rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *Neurosci.* 85, 1-13.
- Sorra, K. E., y Harris, K. M. (1993). Occurrence of three-dimensional structure of synapses between individual radiatum axons and their target pyramidal cells in hippocampal area CA1. *J Neurosci* 13, 391-395.
- Stanton, P. K., Winterer, J., Zhang, X.L., y Muller, W. (2005). Imaging LTP of presynaptic release of FM1-43 from the rapidly recycling vesicle pool of Schaffer collateral-CA1 synapses in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 22, 2451-2461.
- Stevens, C. F., y Wang, Y. (1994). Changes in the reliability of synaptic function as a mechanism for plasticity. *Nature* 371, 704-707.
- Stevens, C. F., y Williams, J. H. (2000). "Kiss and run" exocytosis at hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12828-12833.
- Storm-Mathisen, J. (1977). Localization of transmitter candidates in the brain: The hippocampal formation as a model. *Prog. Neurobiol.* 8, 119-181.
- Sur, C., Korn, H., y Triller, A. (1995). Morphology of the release site of inhibitory synapses on the soma and dendrite of an identified neuron. *J. Comp. Neurol.* 351, 247-260.

- Tong, G., y Jahr, C. E. (1994). Multivesicular release from excitatory synapses of cultured hippocampal neurons. *Neuron* 12, 51-59.
- Triller, A., Seitanidou, T., Franksson, O., y Korn, H. (1985). Size and shape of glycine receptor clusters in a central neuron exhibit a somato-dendritic gradient. *J. Cell. Biol.* 101, 683-688.
- Südhof, T.C. (2000). The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28, 317-320.
- Valentino, R. J., y Dingledine, R. (1981). Presynaptic inhibitory effect of acetylcholine in the hippocampus. *J. Neurosci.* 1, 784-792.
- Voronin, L. L., y Cherubini, E. (2004). 'Deaf, mute and whispering' silent synapses: their role in synaptic plasticity. *J. Physiol.* 557, 3-12.
- Voronin, L. L., Rossokhin, A. V., y Sokolov, M. V. (1999). Intracellular studies of the interaction between paired-pulse facilitation and the delayed phase of long-term potentiation in the hippocampus. *Neurosci Behav Physiol* 29, 347-54.
- Wadiche, J. I., y Jahr, C. E. (2001). Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron* 32, 301-313.
- Wang, J-H., y Kelly, P. T. (1997). Attenuation of paired-pulse facilitation associated with synaptic potentiation mediated by postsynaptic mechanisms *J. Neurophysiol.* 78, 2707-2716.
- Williams, R. W., y Johnston, D. (1993). Muscarinic cholinergic inhibition of glutamatergic transmission. In: *Presynaptic Receptors in the Mammalian Brain* (Dunwiddiw, T. V. y Lovinger, D. M., eds.). Boston: Burkhauser, pp. 27-41.
- Wu, L. G., Malinow, R. y Cline, H. T. (1996). Maturation of a central glutamatergic synapse. *Science* 274, 972-976.
- Xia, Z., y Storm, D. R. (2005). The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 6(4), 267-276.
- Xiao, M-Y., Wasling, P., Hanse, E., y Gustafsson, B. (2004). Creation of AMPA-silent synapses in the neonatal hippocampus *Nature Neurosci.* 7, 236-243.
- Yanagisawa, T., Tsumoto, T., y Kimura, F. (2004). Transiently higher release probability during critical period at thalamocortical synapses in the mouse barrel cortex: relevance to differential short-term plasticity of AMPA and NMDA EPSCs and possible involvement of silent synapses. *Eur J Neurosci* 20, 3006-3018.
- Yasuda, H., Barth, A. L., Stellwagen, D., y Malenka, R. C. (2003). A developmental switch in the signalling cascades for LTP induction. *Nat Neurosci.* 6(1), 15-16.

Zucker, R. S., y Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355-405.

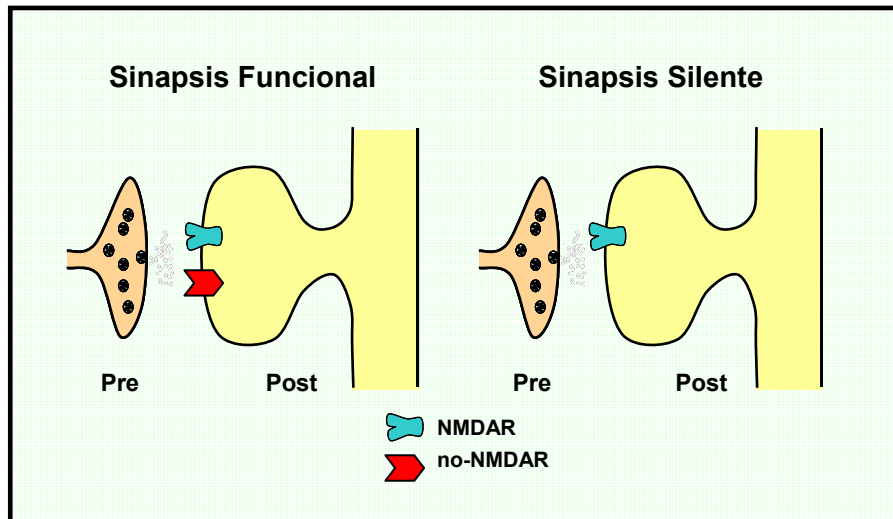


Figura 1. Esquema de la hipótesis tradicional de sinapsis funcionales y silentes. Izquierda, esquema representativo de la noción clásica de una sinapsis funcional, en la que se representa el terminal presináptico y la espina postsináptica que contiene receptores de tipo NMDA y no-NMDA. Derecha, esquema representativo de una sinapsis silente que contiene solo receptores de tipo NMDA en la espina postsináptica.

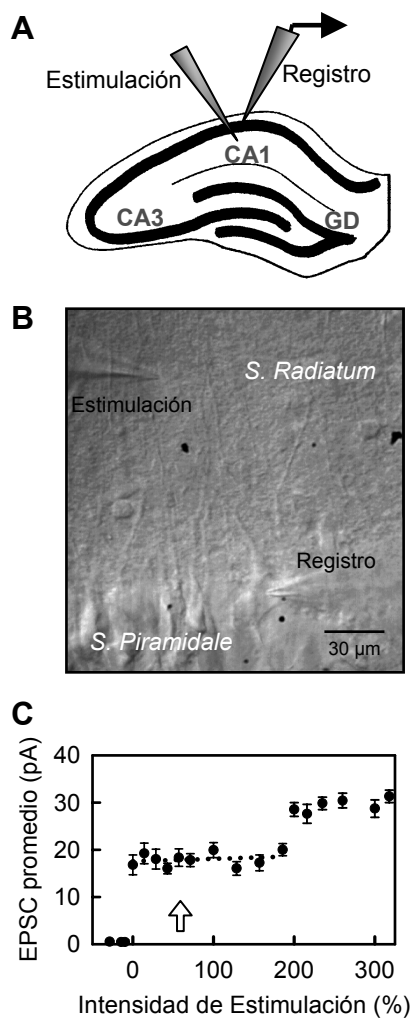


Figura 2. Modelo experimental. **A**, esquema de una rodaja de hipocampo de rata en el que se señalan las principales regiones, y se representa la situación de los electrodos de estimulación y de registro. **B**, imagen de las células del *stratum pyramidale* obtenida por videomicroscopía de infrarrojo y sistema Nomarski, en la que se muestran las posiciones de los electrodos de registro y estimulación. **C**, relación intensidad de estímulo frente a la amplitud de la respuesta, mostrando la amplitud del EPSC promedio a +60 mV (100 trazos sucesivos incluyendo fallos) frente a la intensidad de estimulación (%) para una sinapsis funcional representativa. La flecha indica la intensidad utilizada durante los experimentos ($\approx 50\%$ sobre el umbral de intensidad).

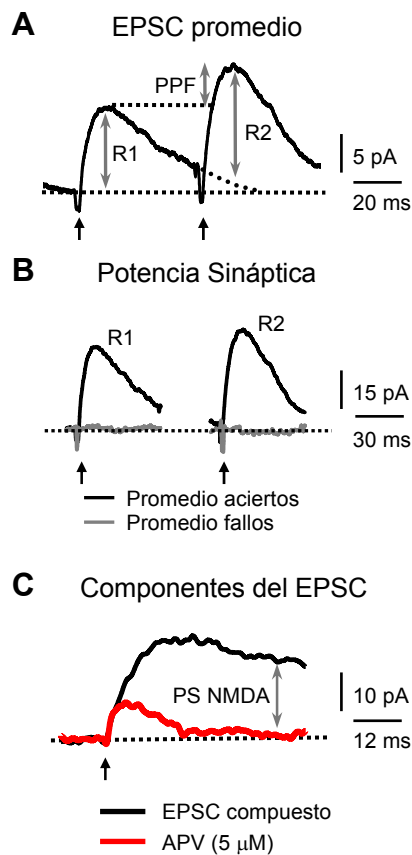


Figura 3. Parámetros de análisis. **A**, EPSC promedio (media de 100 EPSCs unitarios obtenidos con estimulación con pares de pulsos, 50 ms, intervalo entre pulsos) representativo de una sinapsis funcional, en el que las flechas (\updownarrow) señalan como se obtienen los valores de amplitud de la eficacia sináptica del 1° y 2° EPSC (R1 y R2, respectivamente), y también se muestra como se obtiene el índice de facilitación por pares de pulsos. **B**, Trazos representativos en una sinapsis funcional que muestran la potencia sináptica (promedio de los aciertos) de los dos EPSCs (R1 y R2) en negro, y en grise muestra el promedio de los fallos una vez obtenidos por discriminación visual. **C**, Figura representativa de los componentes del EPSC: en negro se muestra el EPSC compuesto, mediado por receptores AMPA y NMDA, y en rojo la respuesta mediada por receptores AMPA (en presencia de APV, 50 mM, bloqueante de los receptores NMDA), en esta respuesta se observa que a 30 ms del artefacto de estimulación la respuesta mediada por estos receptores es prácticamente cero (\updownarrow), por tanto la respuesta del EPSC compuesto en este punto es mediada exclusivamente por receptores NMDA. En todos los paneles las flechas negras (\up) indican la posición del estímulo. En todos los casos se muestran EPSCs a +60 mV debido a que son los registros utilizados en la comparación de las sinapsis silentes con las funcionales.

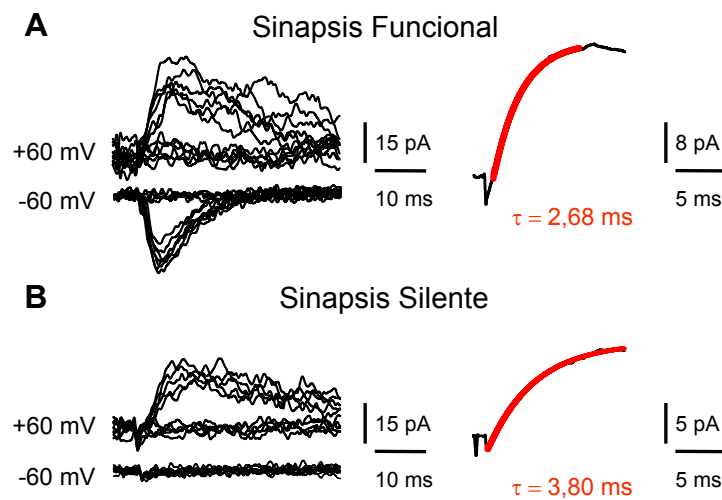


Figura 4. Caracterización de las sinapsis silentes y funcionales. **A**, izquierda, sinapsis funcional representativa, en la que se muestran las respuestas superpuestas a estímulos sucesivos, en la que se observa la naturaleza probabilística de la liberación de neurotransmisor, ya que aparecen fallos y aciertos, tanto en el Vm de reposo (-60 mV), como cuando la célula se despolariza (+60 mV). **A**, derecha, promedio de los aciertos (negro) con el ajuste de una exponencial simple (rojo) y se indican los valores de la constante de tiempo de activación del EPSC (τ). **B**, izquierda, una sinapsis silente representativa, en la que se observa que aparecen respuestas y fallos cuando la célula está despolarizada (+60 mV), mientras que en el Vm de reposo solo aparecen fallos debido al bloqueo por Mg^{2+} de los receptores de tipo NMDA. **B**, derecha, igual que **A**, pero para una sinapsis silente, el promedio de los aciertos (negro) y el ajuste de una exponencial (rojo) que da una constante de activación del EPSC más lenta que la de las sinapsis funcionales, indicativo de la ausencia de receptores AMPA que tienen una cinética más rápida.

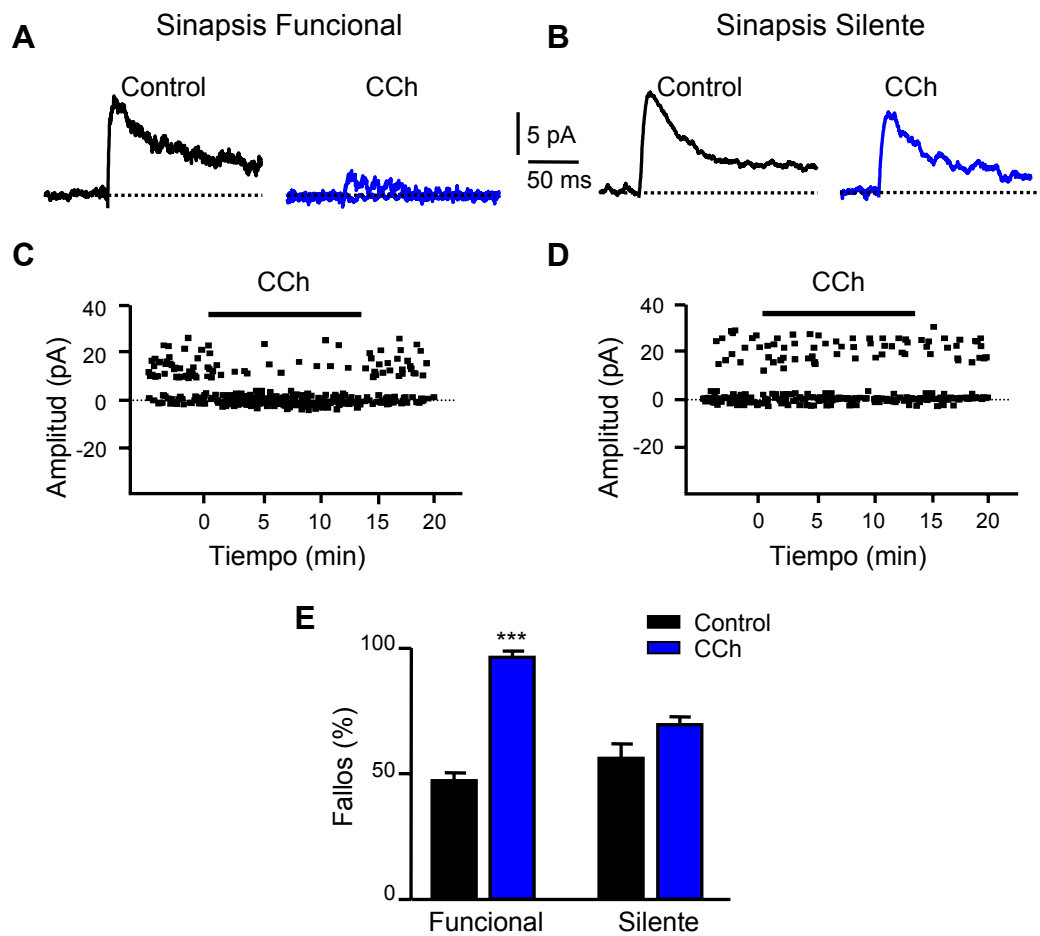


Figura 5. La perfusión con CCh (5 μ M) inhibe las sinapsis funcionales y no afecta a las sinapsis silentes. A, y B, EPSCs promedio a +60 mV en Control (negro) y en CCh (azul) en una sinapsis funcional y silente representativas, respectivamente. C y D, representación del curso temporal del efecto de la aplicación de CCh sobre el pico de amplitud de los EPSCs unitarios a +60 mV, en una sinapsis funcional y una sinapsis silente, respectivamente. Cada cuadrado representa el valor de amplitud de una única respuesta sináptica. E, resumen de datos del efecto de CCh sobre el porcentaje de fallos en el total de sinapsis silentes (n=12) y funcionales (n=14).

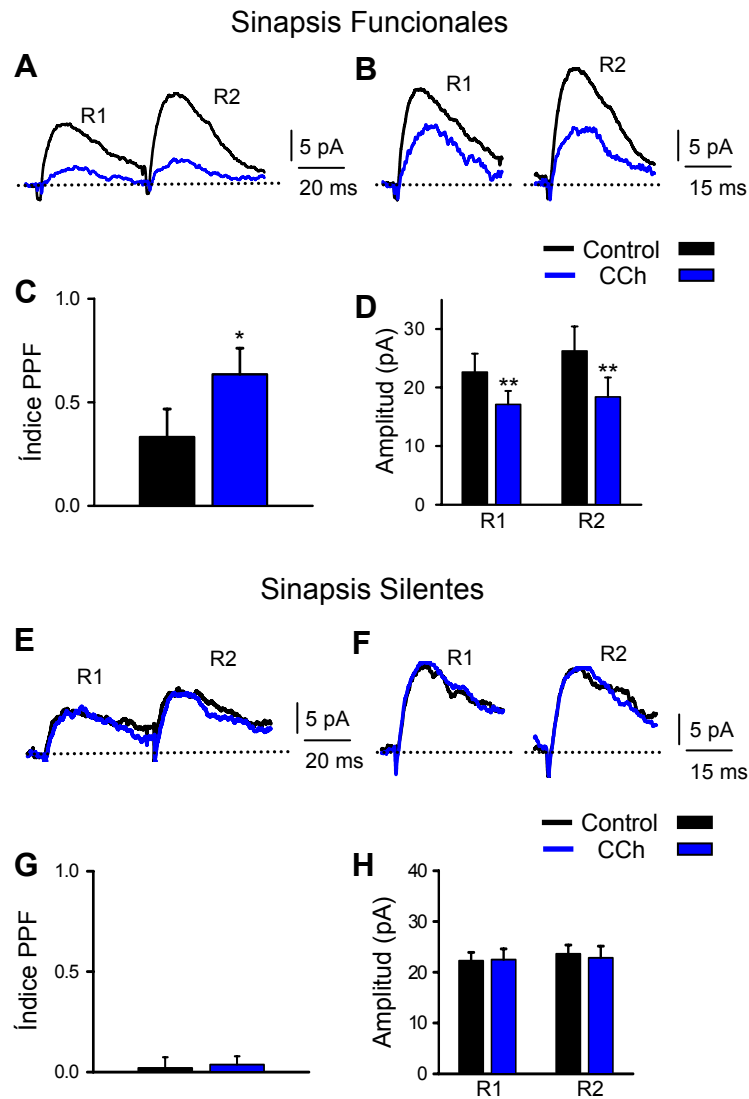


Figura 6. CCh incrementa la PPF en las sinapsis funcionales y no modifica las sinapsis silentes. **A**, EPSCs promedio (+60 mV) en una sinapsis funcional representativa, obtenidos con estimulación mínima con pulsos pareados (50 ms intervalo entre pulsos) en condiciones control (negro) y bajo los efectos de CCh (azul). **B**, ejemplos de la potencia sináptica (promedio de los aciertos) del 1° y 2° EPSC (R1 y R2, respectivamente) en una sinapsis funcional representativa de aquellas en las que la potencia sináptica se ve modificada en presencia de CCh (50%). **C**, resumen de los datos del índice de PPF en las sinapsis funcionales en control y CCh (n=7). **D**, resumen de los datos del efecto de CCh sobre la potencia sináptica de R1 y R2 en las sinapsis funcionales (n=7). **E**, EPSCs promedio (+60 mV) en una sinapsis silente representativa, obtenidos con estimulación con pulsos pareados en condiciones control y CCh. **F**, igual que en **B**, pero en una sinapsis silente representativa. **G**, representación del resumen de datos del efecto de CCh sobre el índice de PPF en las sinapsis silentes (n=12). **H**, igual que en **D**, pero en las sinapsis silentes (n=12).

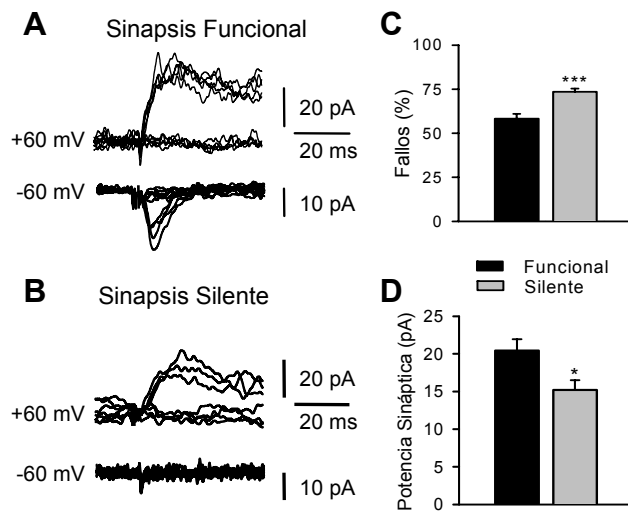


Figura 7. Las propiedades de liberación de neurotransmisor son diferentes en las sinapsis silentes y funcionales. **A**, sinapsis funcional representativa, en la que se muestran las respuestas a 10 estímulos sucesivos obtenidas con estimulación mínima de las CS a ambos potenciales de membrana (-60 mV y +60 mV) donde se observan los fallos y aciertos en la transmisión sináptica. **B**, sinapsis silente representativa, en la que al igual que en **A** se muestran registros de EPSCs unitarios superpuestos a ambos potenciales de membrana. **C**, porcentaje de fallos a +60 mV de las sinapsis silentes (n=26) frente al de las funcionales (n=36). **D**, potencia sináptica (componente NMDA, obtenido midiendo a 30 ms del artefacto de estimulación) de las sinapsis funcionales (n=36) frente a la potencia sináptica de las sinapsis silentes (n=26).

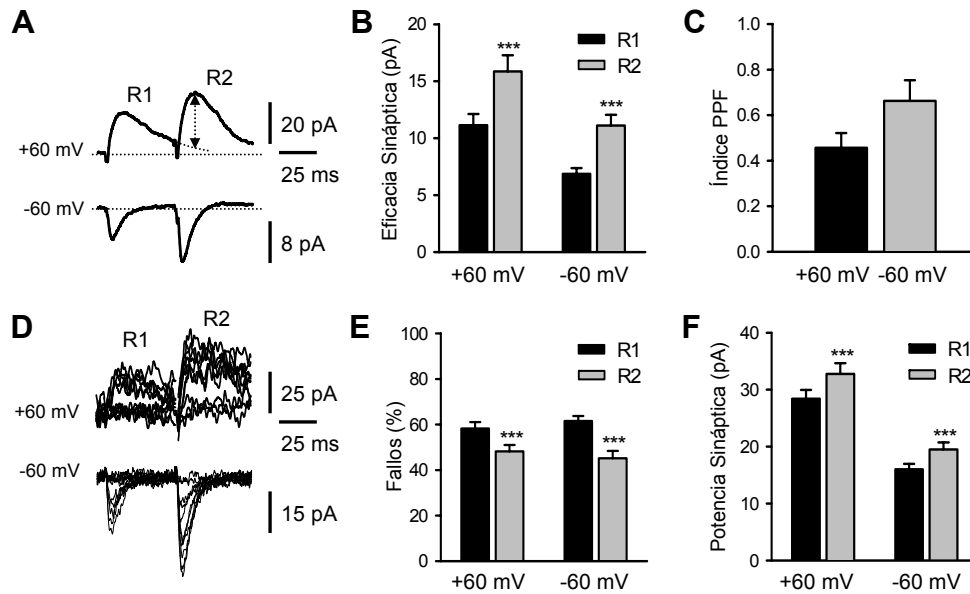


Figura 8. La facilitación por pares de pulsos en las sinapsis funcionales se debe a un menor porcentaje de fallos y una mayor amplitud de R2 frente a R1. **A**, EPSCs promedio (100 trazos consecutivos, incluyendo fallos) a +60 y -60 mV en una sinapsis funcional representativa, obtenidos con estimulación mínima con pares de pulsos. La flecha indica como se obtiene el valor de amplitud de R2. **B**, eficacia sináptica de R1 y R2 a ambos potenciales de membrana. **C**, resumen de datos del índice de PPF (obtenido de los valores de la eficacia sináptica) a ambos Vm. **D**, EPSCs unitarios superpuestos obtenidos con estimulación mínima en una sinapsis funcional a ambos potenciales de membrana, observándose la mayor amplitud y el menor porcentaje de fallos de R2 frente a R1. **E**, porcentaje de fallos de R1 y R2 de las sinapsis funcionales a ambos Vm. **F**, potencia sináptica de ambos EPSCs (R1 y R2) a ambos Vm (+60 y -60 mV) en las sinapsis funcionales. En todos los casos que se muestran el resumen de datos n=36.

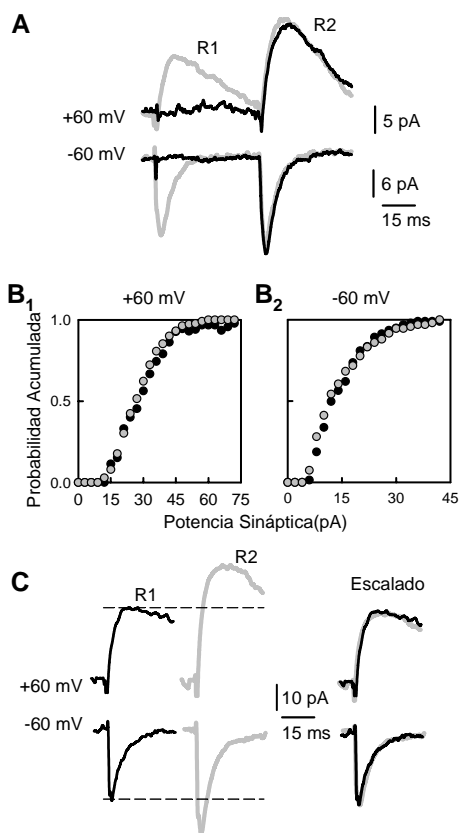


Figura 9. La potencia sináptica del 2º EPSC en las sinapsis funcionales es independiente de la presencia de respuesta frente al primer estímulo. **A**, EPSC representativo obtenido promediando los aciertos del 2º EPSC, a ambos Vm, tanto cuando no hubo respuesta en el 1º EPSC (trazo negro; n=32 respuestas), como cuando hubo un acierto previo en R1 (trazo gris; n=26 respuestas), en una sinapsis funcional representativa. **B₁**, representación de la probabilidad acumulada de la amplitud del pico de R2 (potencia sináptica) cuando R1 falla (●) y acierta (○) a +60 mV. **B₂**, igual que **B₁** pero a -60 mV. **C**, izquierda, ejemplo representativo que muestra el promedio de R1 (trazo negro) y R2 (trazo gris; ambos excluyendo fallos) a -60 y +60 mV durante la estimulación con pares de pulsos. **C**, derecha, se muestran R1 y R2 superpuestos y escalados a la amplitud de R1 para mostrar la similitud de la constante de tiempo de activación, así como de la forma de onda del EPSC.

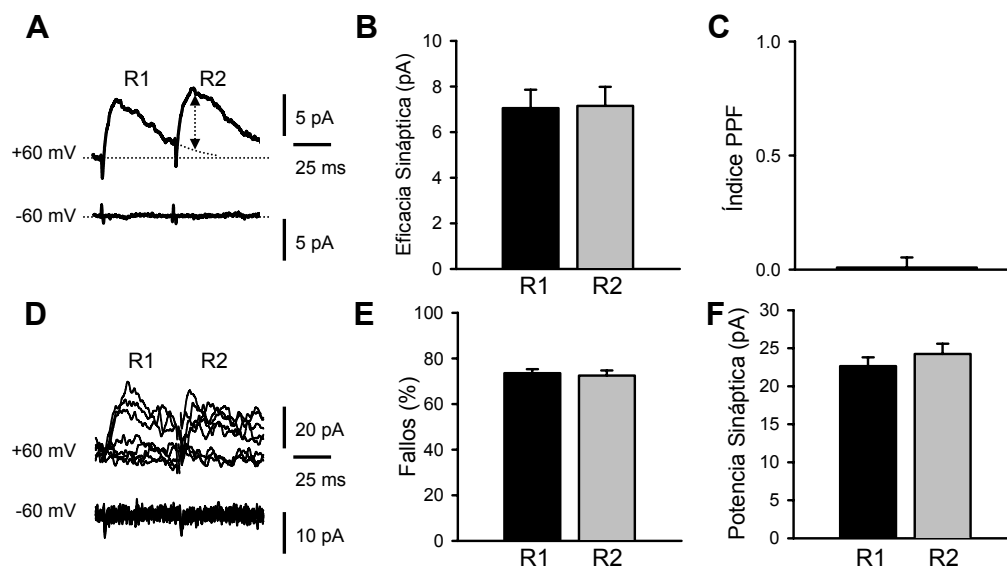


Figura 10. Las sinapsis silentes no presentan facilitación por pares de pulsos. **A**, EPSCs promedio (100 trazos consecutivos) representativos de una sinapsis silente, obtenidos con estimulación por pares de pulsos, a ambos Vm (+60 y -60 mV). La flecha indica como se obtiene el valor del pico de R2. **B**, resumen de datos de la eficacia sináptica en las sinapsis silentes, observándose que no hay diferencias entre el 1° y 2° EPSC. **C**, índice de PPF en el total de sinapsis silentes. **D**, EPSCs unitarios superpuestos, representativos de una sinapsis silente, obtenidos con estimulación mínima con pares de pulsos, en los que se observa la semejanza en las amplitudes de R1 y R2. **E**, porcentaje de fallos de R1 y R2 de las sinapsis silentes. **F**, potencia sináptica de R1 y R2 en las sinapsis silentes. En todos los casos n=26, sólo se muestran los valores a +60 mV, porque a -60 mV no hay respuestas sinápticas.

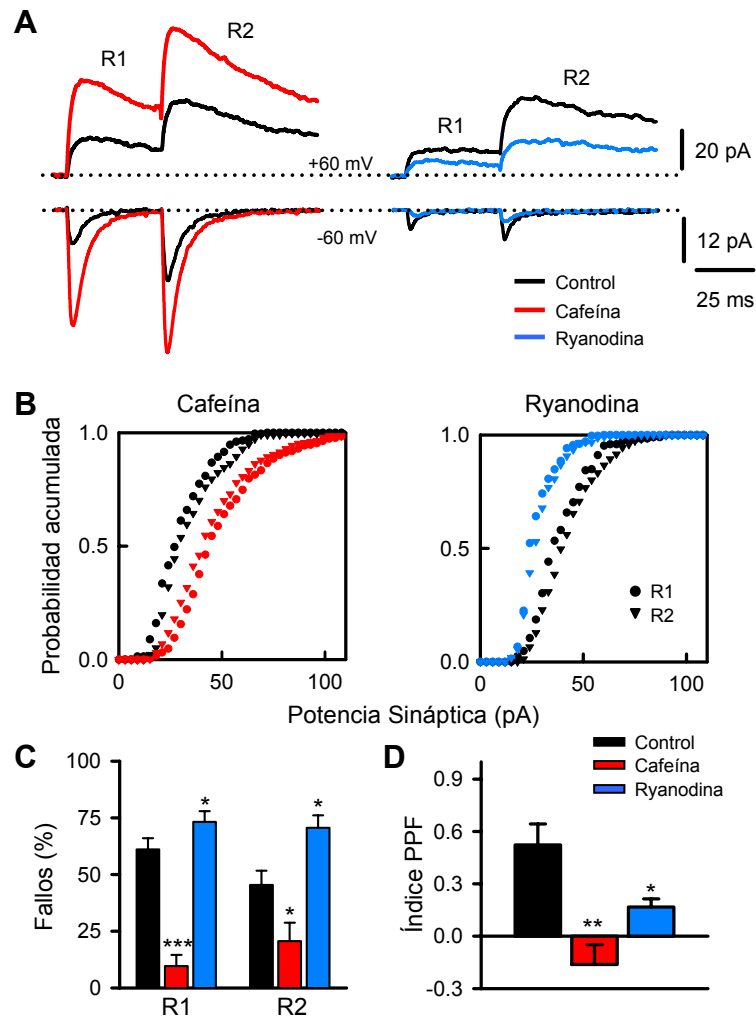


Figura 11. Las sinapsis funcionales son sensibles a modificaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular, y la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. **A**, izquierda, EPSCs promedios (100 trazos consecutivos) representativos de las sinapsis funcionales obtenidos con estimulación por pares de pulsos, en condiciones control (negro) y en presencia de cafeína (10 mM; trazo rojo) a ambos V_m (+60 y -60 mV). **A**, derecha, EPSCs promedios (100 trazos consecutivos) representativos de una sinapsis funcional, mostrando el efecto de la perfusión con ryanodina (100 μM ; trazo azul). **B**, izquierda, representación de la probabilidad acumulada de las amplitudes de pico de R1 (●) y R2 (▼) a +60 mV, en condiciones control y en presencia de cafeína en las sinapsis funcionales ($n=8$). **B**, derecha, igual que el anterior pero mostrando el efecto de ryanodina ($n=6$). **C**, resumen del promedio del porcentaje de fallos de R1 y R2 a +60 mV en condiciones control, y bajo los efectos de cafeína (rojo; $n=8$) y ryanodina (azul; $n=6$). **D**, resumen del promedio del índice de PPF a +60 mV, en control, cafeína, y ryanodina ($n=8$ y $n=6$, respectivamente).

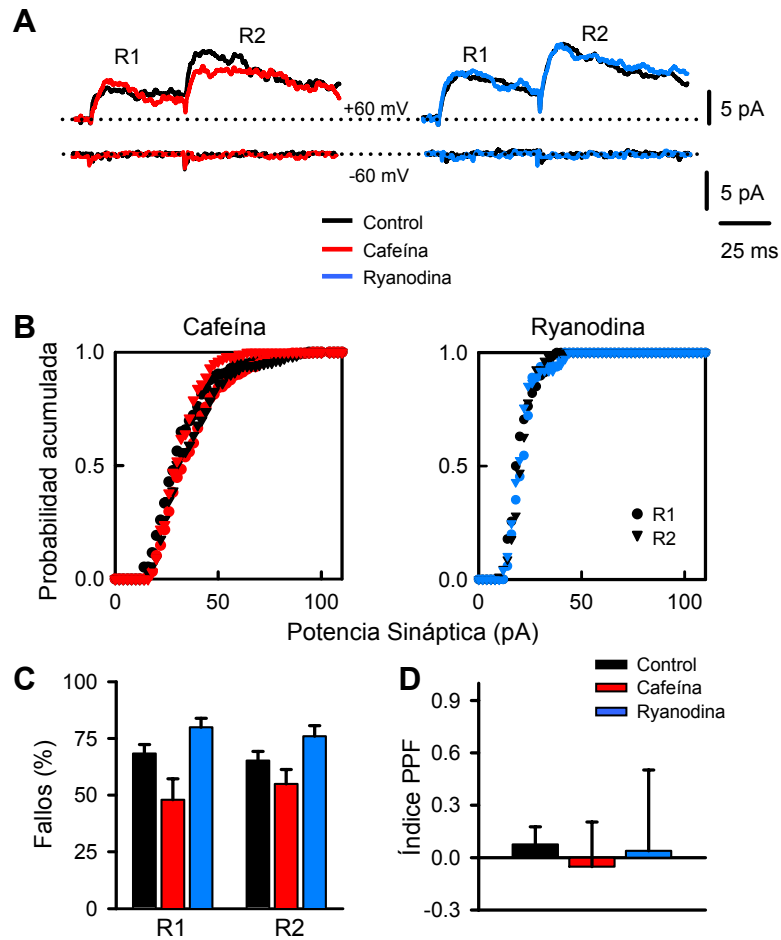


Figura 12. Ryanodina y cafeína no modifican las propiedades de las sinapsis silentes. **A**, izquierda, EPSCs promedio (100 trazos, incluyendo fallos) representativos, en condiciones control (trazo negro), en presencia de cafeína (10 mM, trazo rojo) a +60 y -60 mV. **A**, derecha, EPSC promedio representativo en condiciones control (negro) y en presencia de ryanodina (100 μ M; trazo azul) a ambos Vm, en una sinapsis silente representativa. **B**, izquierda, probabilidad acumulada de la potencia sináptica de R1 (●) y R2 (▼) a +60 mV, en condiciones control (negro) y en presencia de cafeína (rojo) en las sinapsis silentes (n=7). **B**, derecha, igual que anterior pero en presencia de ryanodina (n=8). **C**, resumen del promedio del porcentaje de fallos de R1 y R2 a +60 mV, en condiciones control, en presencia de cafeína (n=7) y en presencia de ryanodina (n=8). **D**, resumen del promedio del índice de PPF a +60 mV, en control, cafeína y ryanodina (n=7 y n=8, respectivamente) en las sinapsis silentes.

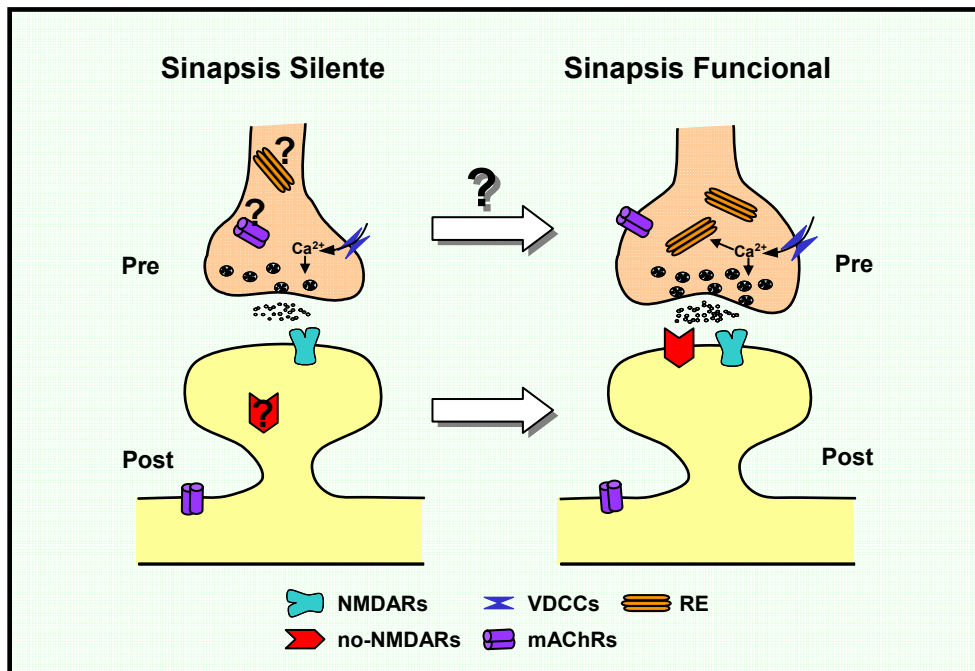


Figura 13. Esquema de las diferencias presinápticas entre sinapsis silentes y funcionales. Representación esquemática de las diferencias presinápticas entre las sinapsis silentes (izquierda) y las funcionales (derecha), integradas con las tradicionalmente aceptadas diferencias postsinápticas. Las flechas indican los cambios que se producen durante fenómenos de plasticidad sináptica. NMDARs: receptores de glutamato tipo NMDA; no-NMDARs: receptores inotrópicos de glutamato no sensibles a NMDA; VDCCs: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje; mACHRs: receptores muscarínicos de ACh; RE: retículo endoplásmico.

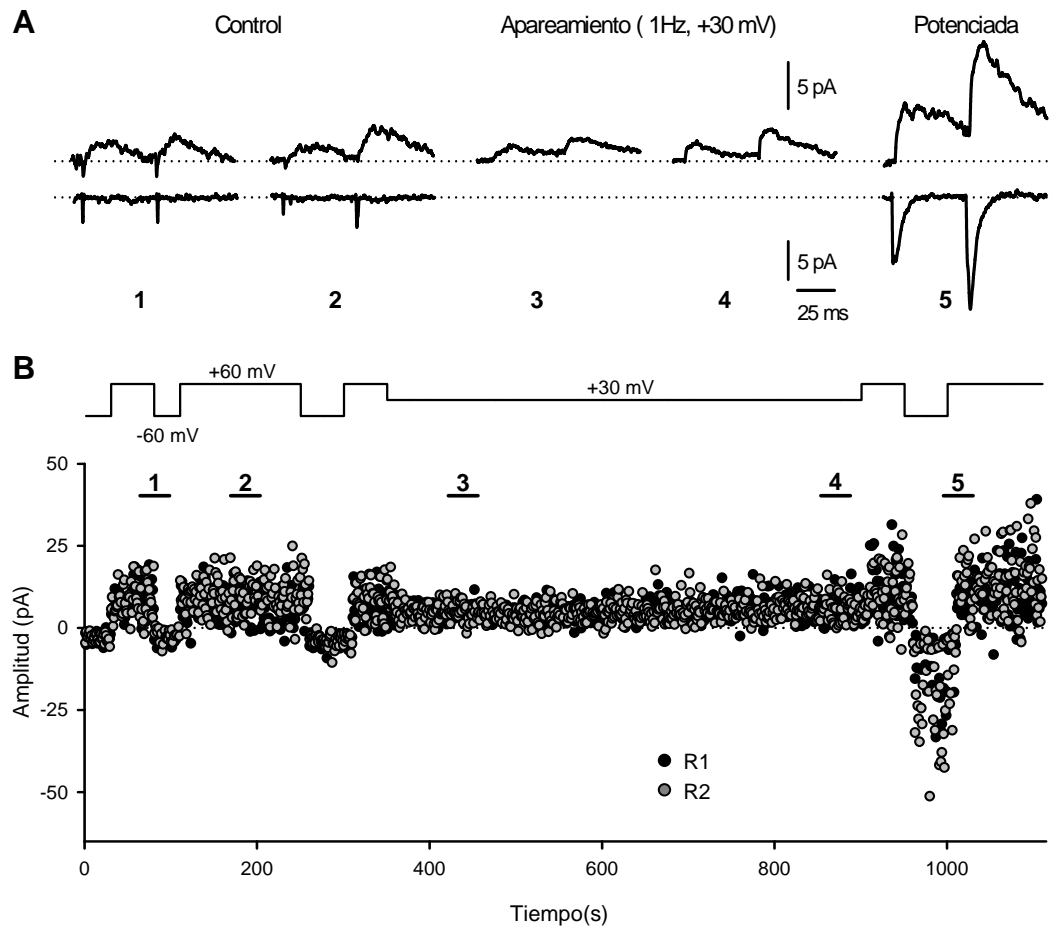


Figura 14. Conversión de sinapsis silentes en sinapsis funcionales. **A**, EPSCs promedios (100 trazos, incluyendo fallos) del proceso de conversión de una sinapsis silente representativa en una sinapsis funcional. De izquierda a derecha se observa como va aumentando progresivamente la eficacia sináptica a potenciales despolarizados y como la cinética de los EPSCs se hace más rápida (indicando la presencia de receptores AMPA, ver figura 13), hasta la completa transformación en una sinapsis funcional (5, derecha) en la que aparecen respuestas a -60 mV previamente ausentes. **B**, arriba, esquema del paradigma de apareamiento de estimulación mínima con pulsos pareados (50 ms intervalo entre pulsos) y la despolarización de la célula postsináptica. **B**, abajo, representación del curso temporal de la conversión de una sinapsis silente representativa en una sinapsis funcional, en el que cada círculo se corresponde al valor de un único EPSC, tanto de R1 (negro) como R2 (gris) a ambos potenciales de membrana. Los números 1-5 indican el instante en el que fueron tomados los ejemplos en el panel **A** de la figura.

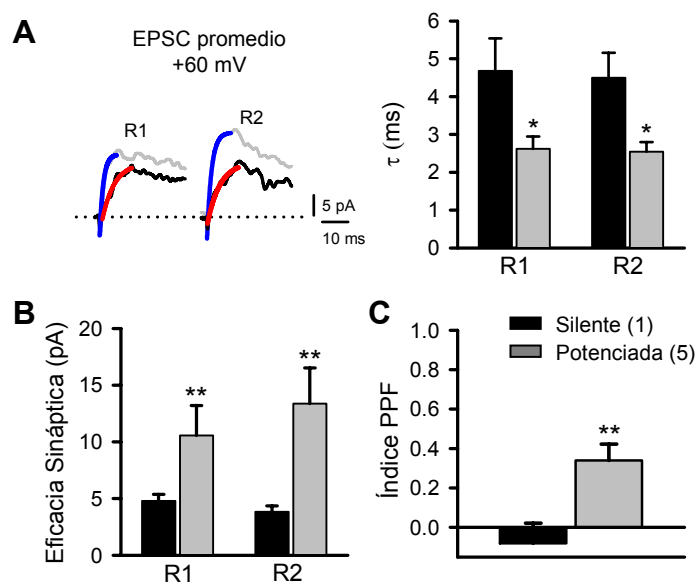


Figura 15. La inserción de receptores AMPA durante la conversión va acompañada de un incremento en la PPF. **A**, izquierda, superposición del EPSC (promedio de los aciertos) de R1 y R2 a +60 mV, antes (negro) y después de la potenciación (gris), con sus correspondientes ajustes exponenciales (rojo, control y azul, potenciada). **A**, derecha, resumen de datos de la modificación de la constante de activación (τ) del EPSC obtenido promediando los aciertos a +60 mV, en condiciones control (Silente (1)), y después de la potenciación (Potenciada (5)), del 1° y 2° EPSC. **B**, representación del incremento en la eficacia sináptica (promedio de aciertos y fallos) de R1 y R2 a +60 mV, antes y después de la potenciación. **C**, índice de PPF antes y después de la potenciación (a +60 mV). En todos los casos $n=10$.

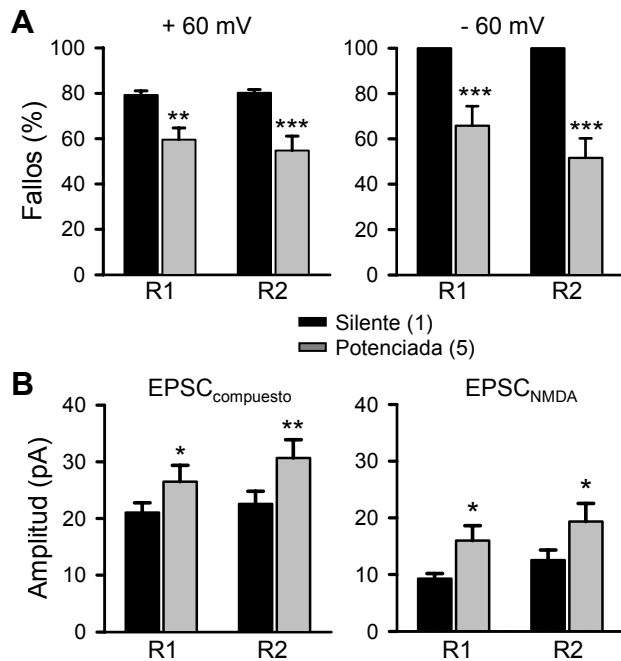


Figura 16. Las sinapsis funcionales “recientemente creadas” adquieren las características propias de las sinapsis funcionales. **A**, izquierda, resumen del promedio del porcentaje de fallos de R1 y R2 a +60 mV antes y después de la potenciación (negro y gris, respectivamente). Observándose que en ambos casos disminuye el porcentaje de fallos, y además R2 falla menos que R1 de manera significativa ($n=10$, $P < 0.05$). **A**, derecha, igual que el anterior pero mostrando el porcentaje de fallos a -60 mV. **B**, izquierda, resumen de la potencia sináptica del EPSC compuesto (obtenido midiendo al pico) de R1 y R2 a +60 mV antes y después de la potenciación ($n=10$). **B**, derecha, resumen de la potencia sináptica del componente NMDA del EPSC (obtenido midiendo a 30 ms del artefacto de estimulación) del 1° y 2° EPSC a +60 mV antes y después de la potenciación ($n=10$).

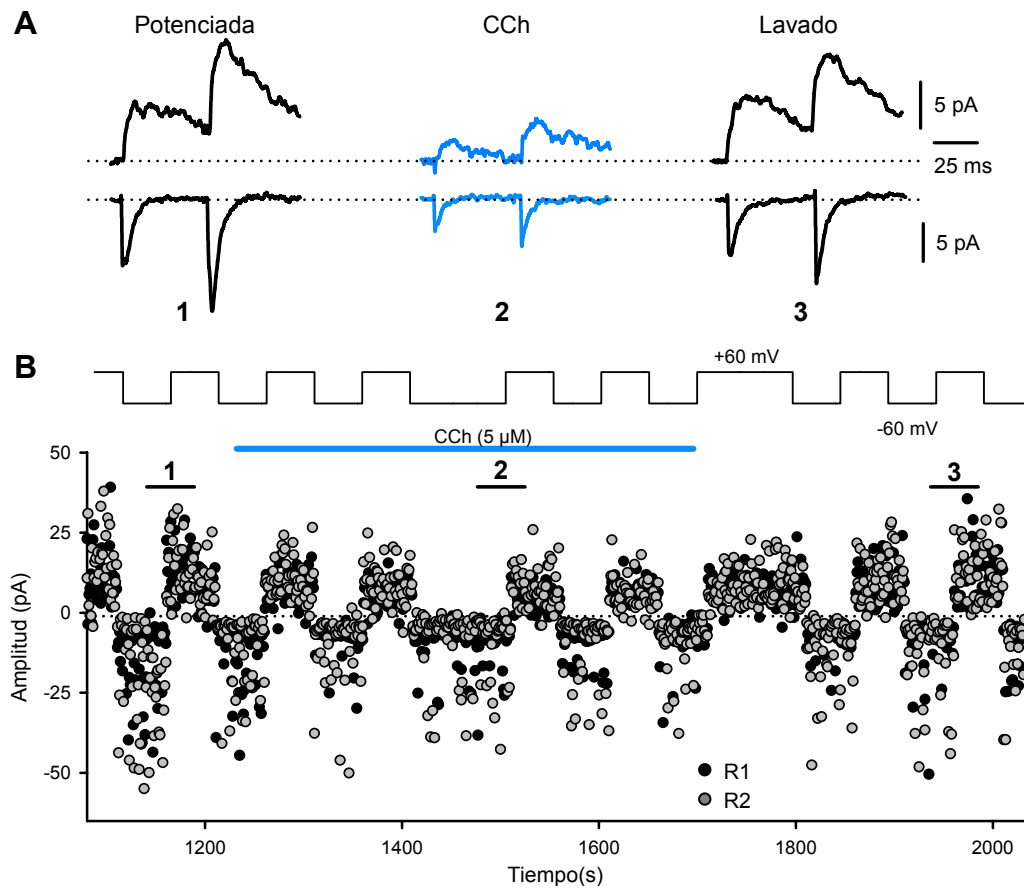


Figura 17. Modulación colinérgica de las sinapsis funcionales de nueva creación. **A**, EPSCs promedios (100 trazos, incluyendo fallos y aciertos) de R1 y R2 a ambos Vm (+60 y -60 mV) de una sinapsis funcional “recién creada” representativa, en los que se observa como esta sinapsis es ahora inhibida por CCh. Los números hacen referencia al panel **B** de la figura indicando el instante que representan los distintos promedios. **B**, arriba, esquema del paradigma de estimulación durante la perfusión con CCh. **B**, abajo, representación del curso temporal del efecto de la perfusión con CCh en una sinapsis potenciada representativa. Cada círculo representa el valor de amplitud de un único EPSC para R1 (negro) y R2 (gris) a +60 y -60 mV.

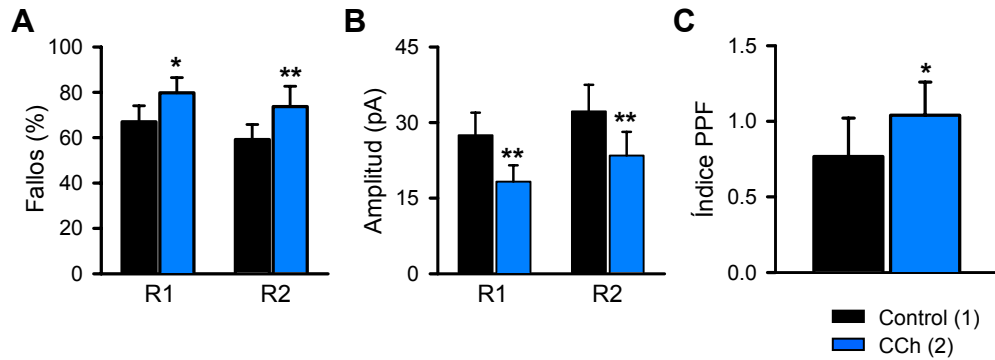


Figura 18. La perfusión con CCh (5 μ M) en las sinapsis funcionales generadas por potenciación de sinapsis previamente silentes tiene los mismos efectos que en las sinapsis funcionales típicas. A, representación del promedio del porcentaje de fallos de R1 y R2 a +60 mV, en una sinapsis funcional recién creada en condiciones control, y en presencia de CCh. **B,** promedio de la potencia sináptica de R1 y R2 a +60 mV, en condiciones control y con CCh. **C,** representación del promedio del índice de PPF a +60 mV, antes y después de la aplicación de CCh en las sinapsis funcionales generadas por conversión de sinapsis silentes. En todos los casos n=6.

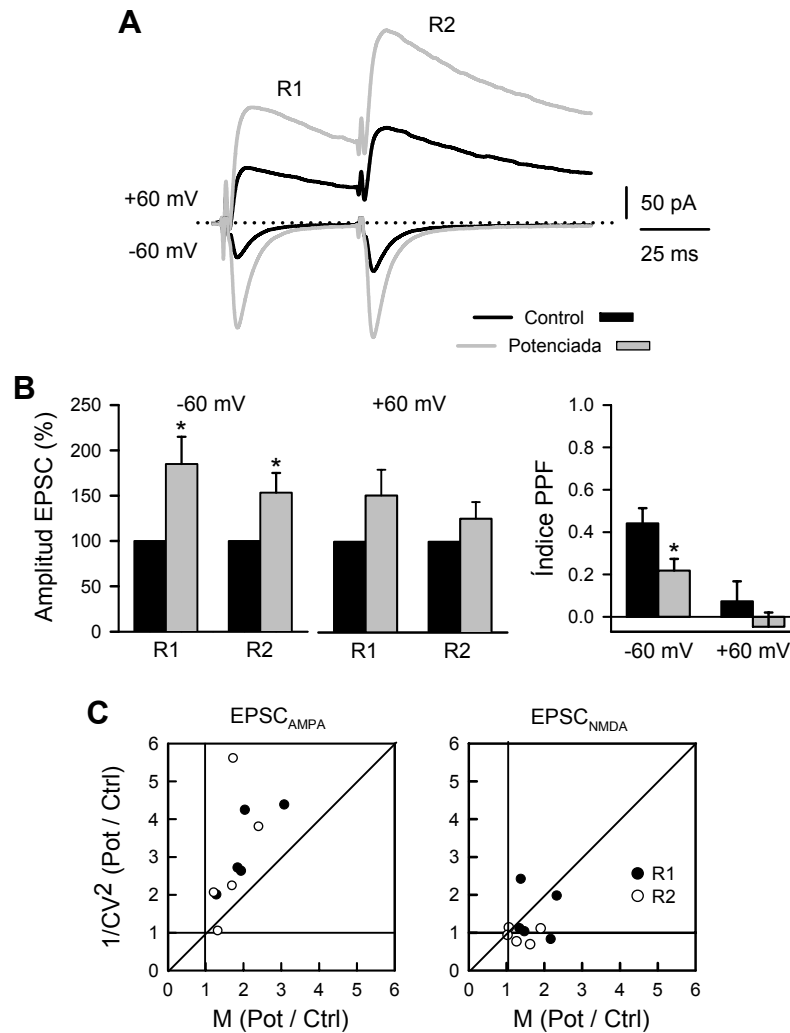


Figura 19. La conversión de sinapsis silentes en funcionales es responsable de la LTP cuando se estimula un conjunto de fibras. **A**, EPSC promedio de R1 y R2 a ambos Vm (+60 y -60 mV) obtenido con estimulación “convencional” con pulsos pareados, en control y después del protocolo de apareamiento (Potenciada). **B**, izquierda, promedio de la amplitud del EPSC (%) de R1 y R2 antes y después de la potenciación, obtenidos midiendo el pico de amplitud a -60 mV, y midiendo a 30 ms del artefacto de estimulación a +60 mV, para estimar la amplitud del componente NMDA. **B**, derecha, promedio del índice de PPF a ambos Vm (-60 mV y +60 mV), antes y después de la potenciación. **C**, izquierda, representación de la variación de $1/CV^2$ (potenciada/control) frente a la variación en la amplitud media (M) del EPSC a -60 mV; de ambos EPSCs (R1 y R2). **C**, derecha, igual que el caso anterior, pero para el componente NMDA, obtenido midiendo a +60 mV a 30 ms del artefacto de estimulación. En todos los casos $n=5$.

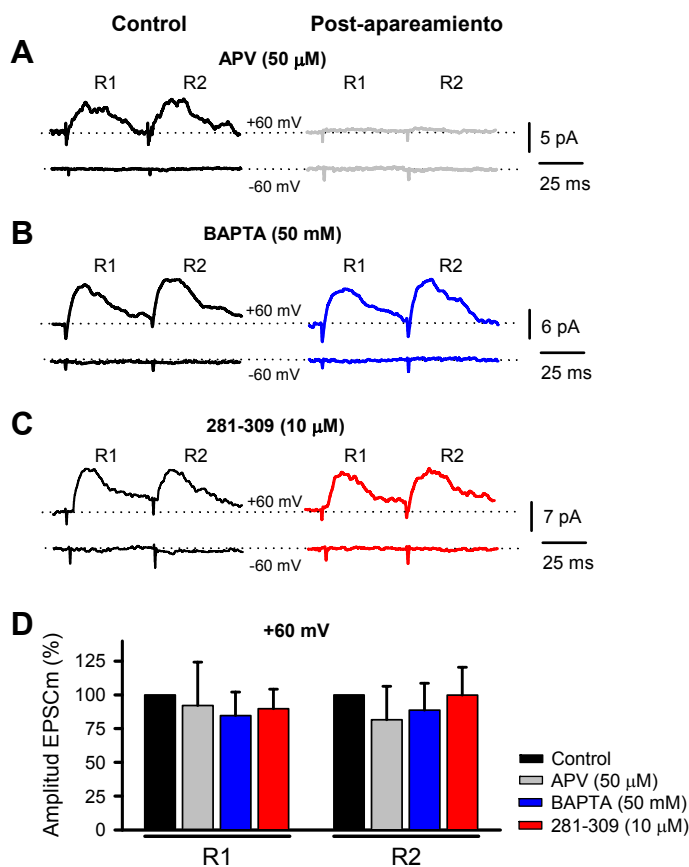


Figura 20. El proceso de conversión de sinapsis silentes en funcionales es dependiente de la activación de receptores NMDA y del incremento de Ca^{2+} postsináptico. **A**, EPSCs promedio (100 trazos, incluyendo fallos y aciertos) de R1 y R2 a ambos Vm (+60 y -60 mV) de una sinapsis silente representativa, antes y después del protocolo de apareamiento en presencia de APV (50 μ M). **B**, EPSCs promedios (100 trazos, incluyendo fallos y aciertos) de R1 y R2 a ambos Vm (+60 y -60 mV) de una sinapsis silente representativa, antes (negro) y después (azul) del protocolo de apareamiento en presencia de BAPTA intracelular (50 mM). **C**, igual que en los casos anteriores, EPSCs promedios, de una sinapsis silente representativa antes y después del protocolo de apareamiento en presencia del péptido 281-309 (10 μ M), bloqueante intracelular de CaMKII. **D**, representación del porcentaje de cambio del EPSC promedio (EPSCm) de R1 y R2 a +60 mV, antes y después del protocolo de apareamiento en presencia de APV (n=4), BAPTA (n=7) y 281-309 (n=5).

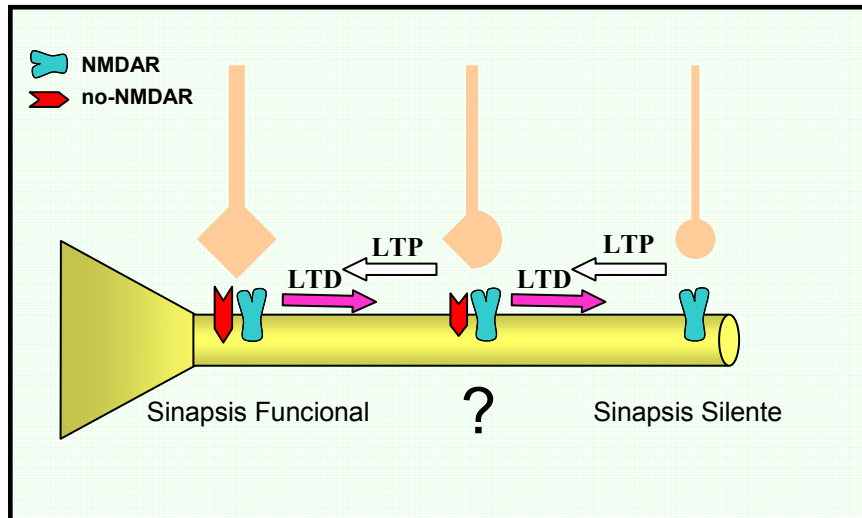


Figura 21. Esquema de la conversión de sinapsis silentes en funcionales durante fenómenos de plasticidad sináptica. Representación esquemática de las diferencias pre y postsinápticas de las sinapsis funcionales (izquierda), silentes (derecha), y un posible estado intermedio entre ambas (centro). En el dibujo puede observarse como la inserción de receptores AMPA va acompañada de cambios en el terminal presináptico.